

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский государственный университет им. А.М. Горького»

ИОНЦ «ЭКОЛОГИЯ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ»

БИОЛОГИЧЕСКИЙ факультет

кафедра ЭКОЛОГИИ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС ДИСЦИПЛИНЫ

**ОЦЕНКА ОСНОВНЫХ СРЕД ОБИТАНИЯ
ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ**

Екатеринбург
2007

**ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ БОЛЬШОГО СПЕЦПРАКТИКУМА
«ОЦЕНКА ОСНОВНЫХ СРЕД ОБИТАНИЯ ЖИВЫХ
ОРГАНИЗМОВ»**

Составитель: к.б.н., доцент Некрасова Г.Ф.,
к.б.н. Некрасова О.А.

ВВЕДЕНИЕ

Большой специальный практикум «Оценка основных сред обитания живых организмов» занимает весомую долю в учебном процессе. Важной его особенностью по сравнению с малым практикумом является то, что большинство работ носят проблемный характер и предполагают приобретение навыков самостоятельных научных исследований. Ознакомившись с методикой, студенты формулируют цель и задачи работы, самостоятельно подбирают и готовят все реактивы и оборудование, необходимые для каждого задания, закладывают и проводят эксперимент, пишут отчеты и защищают работу на зачетном занятии.

Во время лабораторных работ у старшекурсников автоматизируются разнообразные навыки работы в химической лаборатории: умение грамотно использовать химическую посуду, готовить растворы различных концентраций, пользоваться микродозаторами, разнообразными весами, водяными банями, центрифугой. В ходе практикума осваиваются различные методы исследования, такие как титриметрический, потенциометрический, ионометрический, спектрофотометрический и вольтамперометрический.

Содержание большого специального практикума «Оценка основных сред обитания живых организмов» условно можно разделить на два блока.

В первом блоке студентами закладывается модельный эксперимент по выявлению влияния различных тяжелых металлов (или различных концентраций определенного тяжелого металла) на несколько информативных показателей состояния растений. К этим показателям относятся:

- перекисное окисление липидов;
- содержание растворимых белков;
- содержание SH-групп в растворимых белках;

- состояние пигментного комплекса.

Перечисленные показатели определяются у экспериментальных растений через каждые 7 дней. Таким образом, каждый студент осваивает последовательно методику каждой работы, при этом отслеживается состояние растений на протяжении определенного отрезка времени.

Завершает этот блок занятие, на котором происходит теоретическое осмысление результатов однофакторного модельного эксперимента. Для этого проводятся расчеты, статистическая обработка полученных результатов, их перевод в графическую форму и интерпретация.

Второй блок предполагает освоение методов оценки основных сред обитания живых организмов:

- по содержанию растворенного кислорода (для водной среды);
- по содержанию окиси углерода (для воздушной среды);
- по концентрации свинца (для водной среды);
- по содержанию меди (для водной среды);
- по количеству хрома (для водной среды);
- по концентрации нитрат-ионов в растениях (для почвенной и водной среды);
- по концентрации сульфатов в растениях (для воздушной среды);
- по проценту клеток, поврежденных ионами тяжелых металлов (для почвенной и водной среды);
- по степени развития корневых систем проростков (для любых субстратов);
- по наличию локализаций тяжелых металлов в растениях (для любых субстратов).

В большей части лабораторных работ используются растения, поскольку биотестирование с помощью растений разнообразных

субстратов (воды, почвы, воздуха) является стандартным приемом и может быть использовано при оценке степени их загрязнения.

Биотестирование чаще всего является первичным этапом исследования, его преимуществами является простота операций, минимальное оборудование и достаточно быстрое получение информации.

Таким образом, наряду с прямыми методами исследования природных сред студенты-экологи осваивают возможности биотестирования.

В приложение вынесены правила обращения с основным оборудованием, используемым на большом спецпрактикуме: весами электронными и торсионными, водяной баней, центрифугой. В него также вынесены сведения об основных приборных методах – потенциометрический и спектрофотометрический.

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

ЗАКЛАДКА МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА РАСТЕНИЯ

Цель работы: заложить модельный эксперимент, в ходе которого будет выявлено влияние тяжелых металлов на ряд показателей у растений.

Тяжелые металлы

К тяжелым металлам относится группа химических элементов, имеющих плотность более 5 г/см^3 , причем этот термин заимствован из технической литературы, где металлы классифицируются на тяжелые и легкие. Для биологической классификации более целесообразным является разделение не по плотности, а по атомной массе. К тяжелым металлам причисляются все металлы с относительной атомной массой более 40.

Многие металлы из этой группы (медь, цинк, молибден, кобальт, марганец, железо) являются микроэлементами, то есть в малых концентрациях улучшают рост и развитие живых организмов. В больших концентрациях им же присуще негативное влияние на растения и животные. Но есть группа металлов, за которыми закрепилось только негативное понятие – «тяжелые» в смысле «токсичные». Она включает ртуть, кадмий и свинец (Алексеев, 1987).

Ввиду того, что развитие человеческого общества тесно связано с технологией получения и обработки металлов, они интенсивно рассеивались в среде обитания. В ландшафтах, практически не затронутых хозяйственной деятельностью, содержание тяжелых металлов незначительное. Так, кларк кадмия в литосфере составляет $0,13 \text{ мг/кг}$, для ртути он равен $0,083 \text{ мг/кг}$, а для свинца – 16 мг/кг (Алексеев, 1987).

В составе газообразных выделений, дымов, техногенной пыли металлы поступают в атмосферу, со сточными водами в гидросферу,

откуда они переходят в почву, где их миграционные процессы существенно замедляются. Вследствие хорошо выраженной катионной поглотительной способности почва прочно удерживает положительно заряженные ионы металлов. Именно поэтому постоянное поступление их даже в малых количествах на протяжении длительного времени способно привести к существенному накоплению металлов в почве.

Знание содержания тяжелых металлов в почвах и водных объектах дает возможность судить о состоянии чистоты или загрязненности и принимать соответствующие меры, направленные на сохранение почвенного плодородия.

Основными источниками поступления тяжелых металлов в почву в XXI веке являются отходы промышленности (шлаки, зола, цементная пыль и т.д.), сточные воды и бытовой мусор, минеральные удобрения и пестициды, а также атмосфера (естественное выветривание горных пород, транспорт, предприятия химической, тяжелой и атомной промышленности, тепловые электростанции).

По данным Ю.В. Алексеева (1987), в культурном ландшафте наибольшее распространение имеют цинк, свинец, ртуть, кадмий и хром.

Г.В. Добровольский и Е.Д. Никитин (2000) указывают на то, что в почве содержание тяжелых металлов может увеличиваться в десятки раз, что связано с ее огромной активной поверхностью. На сорбционных почвенных барьерах элементы из группы тяжелых металлов могут храниться десятилетиями, поскольку они слабо распространяются вниз по почвенному профилю. Попадая в почву, эти соединения адсорбируются почвенными коллоидами и депонируются преимущественно в гумусированном биологически активном слое. Полагают, что техногенный свинец может сохраняться в гумусовом горизонте около 5000 лет (Benninger et. al., 1975). Кроме свинца почвы также поглощают цинк, кадмий, медь, никель, марганец, ртуть, селен, железо и другие тяжелые металлы. Лучшими задерживающими

свойствами обладают почвы с большой величиной удельной поверхности, то есть с более мелкими почвенными частицами. Песчаные почвы хуже удерживают различные соединения. Ввиду большой ёмкости поглощения гуминовых кислот на них приходится значительное содержание задержанных металлов.

Bowen H. J. M. (1966) приводит диапазоны природных колебаний и средние значения валового содержания наиболее распространённых тяжелых металлов в почвах (табл. 1).

Нормирование содержания металлов в почвах предусматривает установление их предельно допустимых количеств (ПДК). Под ПДК тяжелых металлов следует понимать такую их концентрацию, которая при длительном воздействии на почву и на произрастающие на ней растения не вызывает каких-либо патологических изменений или аномалий в ходе биологических процессов, а также не приводит к накоплению токсичных элементов в сельскохозяйственных культурах и, следовательно, не может нарушить биологический оптимум для сельскохозяйственных животных и человека. ПДК устанавливаются специалистами многих стран в различных экспериментальных исследованиях, и на сегодня эту проблему нельзя считать решенной.

Опыты Н.Г. Зырина с сотрудниками (1985) выявили, что губительные для растений концентрации металлов различны для разных почв. Они также зависят от времени взаимодействия металлов с почвой: чем дольше металл находится в почве, тем прочнее он закрепляется в ней и меньше проявляет его фитотоксичность.

Органические и минеральные коллоиды повышают поглонительную способность почв в первую очередь к ионам, несущим положительный заряд. В свою очередь приближение реакции почвенного раствора к нейтральному значению влечёт за собой увеличение поглонительной способности почв.

Таблица 1

Валовое содержание тяжелых металлов в почвах, мг на 1 кг сухой массы
(Bowen H. J. M., 1966)

Металл	Среднее значение	Возможный диапазон колебания содержания
Серебро	0,1	0,01-5
Барий	500	100-3000
Кадмий	0,06	0,01-0,07
Кобальт	8,0	1,0-40
Хром	100	5,0-3000
Медь	20	2-100
Железо	38000	7000-550000
Ртуть	0,03	0,01-0,3
Лантан	30	1-5000
Марганец	850	100-4000
Молибден	2,0	0,2-5
Никель	40	10-1000
Свинец	10	2-200
Радий	8×10^{-7}	$(3-20) \times 10^{-7}$
Олово	10	2-200
Торий	5	0,1-12
Титан	5000	1000-10000
Уран	1	0,9-9,0
Ванадий	100	20-500
Иттрий	50	25-250
Цинк	50	10-300
Цирконий	300	60-2000
Стронций	300	50-1000

Если руководствоваться сохранением почвенного плодородия, при определении ПДК металлов необходимо ещё учитывать порог чувствительности к ним микроорганизмов. Исследования выявляют сложный процесс приспособления микрофлоры разных почв к токсическому действию тяжёлых металлов (Doelman P., Haanstra L., 1984). Н.Ю. Гармаш с соавторами (1984) предполагают, что микроорганизмы способны выделять ингибирующие свинец метаболиты, а также частично поглощать его. Они установили для бактерий следующий ряд токсичности металлов:

Ag больше Hg²⁺ ... Cd ... Ni²⁺ ... Zn ... Tl ... Pb ... Be .. Cr³⁺ .. Ba.. Sr. . Li

По классификации Н.Ф. Реймерса (цит. по Панин, 1999) тяжелыми металлами следует считать Pb, Cu, Zn, Ni, Cd, Co, Sb, Sn, Bi, Hg.

Для многих тяжелых металлов показано ингибирование ими почвенных ферментов путем связывания Н-группы и изменения структуры белка.

В нашей стране (Алексеев, 1987) разработаны для почв следующие значения ПДК (мг/кг):

мышьяка – 20;

ртути – 2,1;

свинца – 20 (сверх фона, составляющего 12 мг/кг почвы);

хрома шестивалентного – 0,05;

кадмия – 5;

никеля – 50;

мочевина – 80 мг/дм².

Иногда предельные концентрации элементов в почве устанавливаются исходя из предельных концентраций их в продуктах питания растительного происхождения. Для расчетов учитываются коэффициенты накопления тяжелых металлов различными растениями и их органами.

Гигиенически полноценную продукцию легче получить на почвах, которые обеспечивают быстрый рост растений, т. е. на почвах, обладающих оптимальной кислотностью, достаточно высокой ёмкостью поглощения катионов, хорошо насыщенных основаниями, содержащих все необходимые для минерального питания растений элементы в оптимальных количествах. Высокая обеспеченность почв всем необходимым для роста растений вызывает увеличение отношения надземной массы к массе корней. Таким образом, на более плодородных почвах корни охватывают меньший объем субстрата, при этом сокращается относительная поверхность контакта с почвой и, следовательно, случайное поступление из нее загрязнителей.

Ионы металлов являются неперенными компонентами природных водоемов. В зависимости от условий среды (рН, окислительн-восстановительного потенциала, наличия лигандов) они находятся в разных степенях окисления и входят в состав разнообразных неорганических и металлоорганических соединений или в состав минеральных и органических взвесей в воде.

Источниками загрязнения вод тяжелыми металлами служат сточные воды гальванических цехов, предприятий горнодобывающей, черной и цветной металлургии, машиностроительных заводов. Тяжелые металлы входят в состав удобрений и пестицидов и могут попадать в водоемы вместе со стоками с сельскохозяйственных угодий.

Повышение концентрации тяжелых металлов в природных водах часто связано с закислением. Выпадение кислотных осадков способствует снижению значения рН воды и переходу металлов из связанного состояния в свободное.

Существенную роль в очистке водоемов от поллютантов выполняют высшие водные растения. Многие из них накапливают тяжелые металлы в значительных количествах. Их концентрация в растительных тканях может в сотни (Fe), тысячи (Hg, Cu, Cd, Co) и даже

сотни тысяч раз (Zn, Mn) превышать их содержание в воде. В последние годы разрабатываются технологии очистки водоемов от тяжелых металлов с помощью гидрофитов (фиторемедиация).

В соответствии со «Справочником по гидрохимии» (WWW.ecolinn.ru/mc/hydrochem/) ПДК (мг на дм³) для водных объектов по некоторым тяжелым металлам следующие:

кадмий – 0.001,
медь – 0.1,
никель – 0.1,
молибден – 0.25,
железо – 0.3,
свинец – 0.0005,
хром – 0.05,
цинк – 1.0,
марганец - до 160 мкг на дм³

Биотестирование с помощью растений разнообразных субстратов (воды, почвы, воздуха) является стандартным приемом и может быть использовано при оценке степени их загрязнения.

Биотестирование чаще всего является первичным этапом исследования, его преимуществами является простота операций, минимальное оборудование и достаточно быстрое получение информации.

Методы работы. Закладка модельного эксперимента заключается в помещении опытных и контрольных растений в строго идентичные условия, отличающиеся наличием различных тяжелых металлов (или различных концентраций тяжелого металла) в среде обитания экспериментальных растений. Таким образом, данный модельный эксперимент является монофакторным и позволяет изучать влияние отдельно взятого металла на растение.

Реактивы.

1. 1% раствор KMnO_4 или слабый раствор формалина
2. Раствор растворимой соли тяжелого металла с концентрацией катиона 10 мг/л. Для его приготовления рассчитывается содержание металла в соли с учетом воды для обводненных солей и на аналитических весах берется соответствующая навеска, содержащая необходимую массу катиона. Этот раствор является маточным, готовится объемом 2 л. Из него путем разбавления готовятся растворы металла меньших концентраций, на которых выращиваются растения, чаще всего это раствор с содержанием металла 0,25 мг/л.

Оборудование.

1. Мерные колбы на 1, 2 л
2. Весы аналитические
3. Сосуды для выращивания растений (для водных растений сосуды должны быть прозрачные)
4. Маркер по стеклу

Содержание работы

Закладка модельного эксперимента начинается с приготовления маточных растворов тяжелых металлов с концентрацией 10 мг/л и затем из него растворов с концентрацией металла 0,25 мг/л. В зависимости от задач исследования перечень металлов может меняться. Можно использовать умеренноопасные тяжелые металлы, включающие медь, никель, кобальт, хром или высокоопасные тяжелые металлы, такие как кадмий, ртуть, свинец, цинк. Можно, например, сравнить влияние на растения ионов цинка и кобальта.

Удобными объектами исследования являются гидрофиты, например элодея канадская. Для эксперимента используются здоровые побеги длиной около 20 см, которые погружают в растворы в

стеклянные сосуды. Можно вести работу с проростками растений, выращенными из семян (горох, ячмень). В этом случае отбираются семена среднего размера и обрабатываются в течение 10-20 минут слабым раствором формалина или перманганата калия. Затем их помещают на фильтровальную бумагу, подпитываемую необходимым раствором.

Опытные и контрольные растения помещаются в строго идентичные условия (освещенность, температура), отличающиеся только наличием различных тяжелых металлов (или различных концентраций тяжелого металла) в среде обитания экспериментальных растений. Для лучшего поддержания одинаковых условий время от времени сосуды с растениями меняют местами. Контрольные растения выращивают на дистиллированной воде, экспериментальные – на растворах тяжелых металлов. По мере помутнения (примерно один раз в 10 дней) растворы заменяются свежими.

Измерения различных показателей проводят через равные промежутки времени, например через каждые 7 дней. Результаты, полученные для экспериментальных растений, сравниваются с контрольным вариантом.

ВЛИЯНИЕ ПОЛЛЮТАНТОВ В СРЕДЕ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ (ПОЛ)

Цель работы: определить содержание ТБК-реагирующих продуктов, являющихся показателем разрушения липидов в клетках растений.

Загрязнение окружающей среды вызывает образование повышенных количеств активных форм кислорода в клетках живых организмов. Примерами таких форм является супероксидный радикал ($O_2^{\cdot-}$), пероксид водорода (H_2O_2) и гидроксильный радикал (HO^{\cdot}). Они обладают очень высокой агрессивностью и способны повреждать практически все компоненты клетки.

Активные радикалы, главным образом HO^{\cdot} , взаимодействуют с органическими веществами. Так, в липидах (в основном в полиненасыщенных жирных кислотах) активные формы кислорода вызывают цепные реакции с накоплением липидных (L^{\cdot}), пероксильных (LOO^{\cdot}), алкоксильных (LO^{\cdot}) и других радикалов. Участие тяжелых металлов с переменной валентностью, таких как медь, железо, кобальт и др. приводит к разветвлению этой цепи.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) является индикаторной реакцией повреждения клеточных мембран. В результате ПОЛ образуются конечные метаболиты (малоновый диальдегид, этан, пентан и др.), реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реагирующие продукты). Таким образом, содержание ТБК-реагирующих продуктов является показателем разрушения липидов в клетках растений.

Методы работы. Тиобарбитуровая кислота образует окрашенные соединения с продуктами перекисного окисления липидов, которые экстрагируются н-бутанолом и определяются количественно спектрофотометрическим способом.

Реактивы

1. 0,1М фосфатный буфер pH 7,4. Составляющие буфера можно готовить заранее и хранить при температуре 6°C в течение одного месяца. Сначала готовятся 0,1М растворы двузамещенного фосфата натрия $\text{Na}_2\text{HPO}_4(12\text{H}_2\text{O})$, либо $\text{Na}_2\text{HPO}_4(2\text{H}_2\text{O})$ и однозамещенного фосфата натрия $\text{NaH}_2\text{PO}_4(\text{H}_2\text{O})$, либо $\text{NaH}_2\text{PO}_4(2\text{H}_2\text{O})$. Далее в мерную колбу на 200 мл отмеряют мерным цилиндром 81 мл 0,2М раствора Na_2HPO_4 , 19 мл 0,2 М раствора NaH_2PO_4 и доводят дистиллятом раствор до метки. Перед использованием буферного раствора значение pH проверяют с помощью pH-метра и, если необходимо, корректируют добавлением соответствующего реактива.
2. 1%-й раствор ортофосфорной кислоты (1 мл концентрированной H_3PO_4 на 100 мл H_2O)
3. FeSO_4 – 28 мг на 10 мл H_2O
4. 0,6%-й раствор тиобарбитуровой кислоты готовится на 0,1М фосфатном буфере pH 7,4. Для более быстрого растворения лучше нагреть смесь на водяной бане (70-80°C).
5. н-бутанол

Все растворы готовят перед проведением реакции.

Оборудование

1. Фарфоровые ступки и пестики
2. Пипетки (дозаторы)
3. Капроновая ткань
4. Стекланные пробирки объемом 10-15 мл
5. Стекланный песок для гомогенизации проб
6. Весы технические
7. Водяная баня
8. Центрифуга
9. Спектрофотометр
10. Маркер по стеклу

11. pH-метр

Содержание работы. Растительный материал (0,5 г сырых листьев) растирают в ступке с небольшим количеством (1,5-2 мл) 0,1 М фосфатного буфера pH 7,4 и добавлением стеклянного песка до гомогенного состояния. Конечный объем буфера составляет 5 мл. Гомогенат фильтруют через капроновую ткань, фильтрат используют для определения интенсивности процессов ПОЛ.

Далее работа ведется в 3-х повторностях как для растений, выращиваемых на дистиллированной воде, так и для образцов из среды, содержащей металл.

Поместить 0,3 мл фильтрата в стеклянную пробирку, добавить в нее 3 мл раствора ортофосфорной кислоты, 1 мл раствора ТБК и 0,1 мл раствора FeSO_4 . Опытные пробы помещают на водяную баню, нагретую до 95-100°C на 1 час. Затем быстро охлаждают в сосуде с холодной водой (10°C). После охлаждения к каждой пробе приливают 4 мл н-бутанола, встряхивают и центрифугируют 10 мин при 10000 g. После центрифугирования верхний слой бутанола с окрашенным экстрактом осторожно снимают пипеткой и переносят в чистые, *сухие* кюветы. ***Присутствие на стенках кюветы капелек воды искажает полученные результаты!***

Оптическую плотность бутанольного экстракта измеряют на спектрофотометре против н-бутанола при D_{532} и D_{600} . Устройство спектрофотометра и правила работы с ним изложены в приложении.

Представление результатов. Значения оптических плотностей экстракта заносят в таблицу

Образец	D_{532}	D_{600}

Содержание ТБК-реагирующих продуктов рассчитывают по формуле:

ТБКРП (Мм/г сырого веса) = $(D_{532} - D_{600}) / (155 \cdot 0,3 \cdot 0,1)$, где

ТБКРП – ТБК-реагирующие продукты

155 – коэффициент экстинкции тиобарбитуровой кислоты (ТБК), Мм⁻¹ см⁻¹

0,3 – объем фильтрата, внесенного в реакционную смесь, мл

0,1 – содержание сырой массы листьев, эквивалентное 1 мл фильтрата, г.

СОДЕРЖАНИЕ SH-ГРУПП В РАСТВОРИМЫХ БЕЛКАХ РАСТЕНИЙ КАК ТЕСТ НА ДЕЙСТВИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Цель работы: оценить состояние окружающей среды по содержанию SH-групп в белках.

Загрязнение окружающей среды различными поллютантами, в том числе тяжелыми металлами, постоянно увеличивается. В последнее время активно изучаются биологические механизмы аккумуляции и детоксикации избытка тяжелых металлов, поступающих в почву, атмосферу, водную среду. Один из известных способов защиты растений от вредного влияния тяжелых металлов является биосинтез низкомолекулярных белков и пептидов, обогащенных SH-группами (металлотионеинов и фитохелатинов). Металлсвязывающие белки и пептиды синтезируются в норме в незначительном количестве. Их содержание в клетке резко возрастает при действии тяжелых металлов и снижается в случае уменьшения их концентрации в питательном субстрате. Металлотионеины имеют низкую молекулярную массу (до 10 Кд) и высокое содержание цистеина (около 30%). В настоящее время выделено три типа металлотионеино-подобных генов растений, продукты которых различаются по расположению остатков цистеина.

Фитохелатины имеют общую структуру $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, где $n = 2-11$, и имеют также название класс III металлотионеины. Известно, что синтезирующая их фитохелатинсинтетаза напрямую активируется тяжелыми металлами.

Реактив Элмана или 5,5-дитиобис(2-нитробензойная) кислота (ДТНБ) может вступать в реакцию с SH-группами белков и пептидов. Образующийся 5-тио-2-нитробензойный анион имеет интенсивную окраску желтого цвета.

Методы работы. Количественное определение SH-групп в растворимых и высокополимерных соединениях клетки основано на способности ДТНБ образовывать окрашенное соединение с SH-

группами белков и пептидов, интенсивность окраски которого сравнивается с эталонными растворами глутатиона на спектрофотометре.

Реактивы.

1. *0,1M трис-HCl буфер pH 7,8-8,0.* Если одновременно выполняется работа по определению белков, этот буфер отдельно для определения SH-групп готовить не надо! Этот буфер используют для приготовления среды выделения и реакционной среды при определении общего количества растворимых SH-групп и мембранно-связанных SH-групп. Для буфера необходим трис-(гидроксиметил)-аминометан (М, 121) и 0,1 н HCl (готовят из фиксанала).

А. Трис – 1,21 г + 50 мл H₂O_{дист.}

Б. HCl 0,1 н – 30 мл. Сначала из фиксанала готовят 100 мл 1 н раствора HCl, который будет необходим для корректировки Рн буферов. Затем путем разбавления из него получают 0,1 н HCl общим объемом 100 мл.

Растворы смешивают, корректируют рН. При подведении значения Рн обычно приходится сдвигать его в более кислую сторону. Для этого используют 1 н раствор HCl, который добавляется по каплям и после перемешивания раствора проверяется получившееся значение рН с помощью рН-метра. Ввиду высокой буферности раствора значение рН может резко измениться даже от одной капли HCl. Затем конечный объем доводят до 100 мл дистиллированной водой.

2. *0,25 M трис-HCl буфер pH 7,5.* На этом буфере растворяют реактив Элмана, 5,5-дитиобис(2-нитробензойная) кислота (ДТНБ):

а. Трис – 3,025 г + 50 мл H₂O_{дист.}

Б. HCl 0,1 н – 40,3 мл

Растворы смешивают, корректируют рН, , конечный объем доводят до 100 мл дистиллированной водой.

3. Додецилсульфат натрия (SDS) – 1 г на 10 мл H₂O_{дист.} (10%-й р-р)

4. Раствор реактива Элмана (ДТНБ; М, 396) – 19,8 мг (50 мкМ) на 5 мл 0,25 М трис-НСl буфера Рн 7,5. Для лучшего растворения нагревают на водяной бане при 37°C.

5. Глутатион-SH (М, 303) – 3,03 мг на 10 мл H₂O_{дист.} (1мМ р-р).

Раствор необходим для построения калибровочной кривой (непосредственно к каждому опыту). Из этого раствора готовят разведения концентрацией: 0,5; 0,25; 0,125; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,01 Мм.

Оборудование.

1. Стеклянные пробирки объемом 10-15 мл (для проведения реакции) и мерные пробирки на 10 мл
2. Штативы для пробирок
3. Пипетки (дозаторы)
4. Стеклянные палочки
5. Секундомер (таймер)
6. Центрифуга (рефрижераторная)
7. Стеклянный песок для гомогенизации проб
8. Гомогенизатор или фарфоровые ступки
9. Охлаждающее устройство или жидкий азот
10. Водяная баня
11. Спектрофотометр (СФ-46 или другой)
12. Маркер по стеклу
13. рН-метр
14. Весы аналитические
15. Большой стеклянный стакан

Содержание работы

Если параллельно выполняется работа по определению белков, то можно воспользоваться полученными в ней супернатантами, *которые далее не разбавляются.*

Листья элодеи (или другого растения) отделяют от стебля и помещают в чашку Петри на смоченную дистиллированной водой фильтровальную бумагу. Растительный материал (300 мг сырых листьев) растирают на льду в ступке с небольшим количеством 0,1М трис-HCl буфер pH 7,8-8,0 (1-2 мл), с добавлением стеклянного песка. Гомогенат переносят в центрифужную пробирку, обмывая ступку небольшим (0,5 мл) количеством буфера. Общий объем используемого буфера – 4 мл. Гомогенат центрифугируют 10 мин при 9 тысячах оборотах в минуту. Супернатант сливают в пробирку и определяют количество SH-групп с реактивом Элмана.

Далее работа ведется в 3-х повторностях как для растений, выращиваемых на дистиллированной воде, так и для образцов из среды, содержащей металл.

Определение SH-групп проводят в длинных пробирках. Готовят одну контрольную пробу для учета окраски реактивов и опытные пробы растений из дистиллята и раствора металла.

Опытная проба:

- а. 10%-й р-р SDS – 0,3 мл
- б. супернатант – 0,3 мл
- в. 0,1 М трис-HCl буфера, pH 7,8 – 2 мл
- г. раствора реактива Элмана (ДТНБ) – 0,2 мл

Контрольная проба:

- а. 10%-й р-р SDS – 0,3 мл
- б. 0,1 М трис-HCl буфер, pH 7,8 – 2,5 мл

Растворы тщательно перемешивают! Затем пробирки инкубируют 1 час на водяной бане при 37°C. После этого измеряют оптическую плотность против контрольной на спектрофотометре при длине волны 412 нм.

В качестве вещества с известным содержанием SH-групп используют глутатион-SH. Готовят растворы глутатиона следующих

концентраций: 0,5; 0,25; 0,125; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,01 Мм. Реакцию с ДТНБ проводят как с опытными пробами, только вместо супернатанта используют раствор глутатиона. Пробирки с добавленными реактивами аналогичным образом инкубируют, после чего измеряют их оптические плотности на спектрофотометре против контрольной на спектрофотометре при длине волны 412 нм. Устройство спектрофотометра и правила работы с ним изложены в приложении.

Представление результатов. Результаты должны быть представлены в виде таблицы

Образец	D_{412}	C, Мм

Для перевода значения оптической плотности в микромоли SH-групп строят калибровочный график по глутатиону-SH.

По оси ординат откладывают оптическую плотность (D), по оси абсцисс – концентрацию глутатиона в Мм(C).

Оптическая

плотность (D)



Концентрация, мкг/мл (C)

Расчет SH-групп можно осуществляется через калибровочную кривую: 1 мкм восстановленного глутатиона соответствует 1 мкм –SH. Конечный результат выражают в микромолях SH-групп на 1 мг белка.

СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ РАСТЕНИЙ КАК ТЕСТ НА ДЕЙСТВИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Цель работы: оценить состояние окружающей среды по содержанию белков в клетках.

В большинстве случаев уровень токсичности тяжелых металлов оценивается по ростовым показателям растений. Однако имеются сведения, что у высших растений и водорослей системы фотосинтеза, синтеза пигментов и белков наиболее подвержены действию тяжелых металлов.

Один из известных способов защиты растений от вредного влияния тяжелых металлов является биосинтез низкомолекулярных белков и пептидов, обогащенных SH-группами (металлотионеинов и фитохелатинов). Некоторые ферменты, содержащие в большом количестве SH-группы (например, рибулозо-бисфосфат карбоксилаза, составляющая до 50% от растворимых белков клетки) также способны связывать значительные количества металлов. Поэтому оценка общего количества растворимых белков, куда входят и ферментативные белки клетки, может быть полезной для оценки защитных механизмов клеточного уровня.

Кроме того, показатель содержания растворимых белков необходим для расчета количества SH-групп в белках.

Методы работы. Количественное определение белков основано на их способности окрашиваться группой реактивов, затем интенсивность окраски сравнивается с эталонными растворами альбумина на спектрофотометре.

Реактивы.

1. 0,1М трис-HCl буфер pH 7,8-8,0. Этот буфер используют для приготовления среды выделения белков. Для буфера необходим трис-

(гидроксиметил)-аминометан (М, 121) и 0,1 н HCl (готовят из фиксанала).

А. Трис – 1,21 г + 50 мл H₂O_{дист.}

Б. HCl 0,1 н – 30 мл. Сначала из фиксанала готовят 100 мл 1 н раствора HCl, который будет необходим для корректировки Рн буферов. Затем путем разбавления из него получают 0,1 н HCl общим объемом 100 мл.

Растворы смешивают, корректируют рН. При подведении значения Рн обычно приходится сдвигать его в более кислую сторону. Для этого используют 1 н раствор HCl, который добавляется по каплям и после перемешивания раствора проверяется получившееся значение рН с помощью рН-метра. Ввиду высокой буферности раствора значение рН может резко измениться даже от одной капли HCl. Затем конечный объем доводят до 100 мл дистиллированной водой.

2. *Медно-щелочной реактив.* В 100 мл воды растворяют обязательно в указанной последовательности:

а. CuSO₄ (5H₂O) (М, 250) – 80 мг (0,32 Мм)

б. К-Na- виннокислый (сегнетова соль; М, 282) – 100 мг (0,35 Мм)

в. Na₂CO₃ (М, 106) – 10,0 г (94 Мм)

г. NaOH (М, 40) – 2,0 г (50 Мм)

Раствор хранится в холодильнике не более 3-5 дней.

3. *Рабочий раствор реактива Фолина:* 0,1 н реактив Фолина разбавляют в 4 раза (1:3). Готовят непосредственно перед употреблением.

4. *Свежий раствор альбумина* (для калибровочного графика): 5 мг альбумина растворяют в 50 мл H₂O_{дист.} Хранят в холодильнике не более трех дней.

Оборудование.

1. Стеклянные пробирки объемом 10-15 мл (для проведения реакции) и мерные пробирки на 10 мл

2. Штативы для пробирок
3. Пипетки (дозаторы)
4. Секундомер (таймер)
5. Водяная баня
6. Спектрофотометр (СФ-46 или другой)
7. Маркер по стеклу
8. рН-метр
9. Весы аналитические
10. Стекланный песок для гомогенизации проб
11. Большой стекланный стакан

Содержание работы

Листья элодеи (или другого растения) отделяют от стебля и помещают в чашку Петри на смоченную дистиллированной водой фильтровальную бумагу. Растительный материал (300 мг сырых листьев) растирают на льду в ступке с небольшим количеством 0,1М трис-НСl буфер рН 7,8-8,0 (1-2 мл), с добавлением стеклнного песка. Гомогенат переносят в центрифужную пробирку, обмывая ступку небольшим (0,5 мл) количеством буфера. Общий объем используемого буфера – 4 мл. Гомогенат центрифугируют 10 мин при 9 тысячах оборотах в минуту. Супернатант сливают в пробирку и определяют количество мембранно-связанных белков по Шактерле .

Перед проведением реакции супернатант разбавляют в 10 раз 0,1М трис-НСl буфером рН 7,8-8,0, достаточно приготовить 5 мл раствора.

Далее работа ведется в 3-х повторностях как для растений, выращиваемых на дистиллированной воде, так и для образцов из среды, содержащей металл.

Затем в длинных стекланных пробирках готовят одну контрольную пробу для учета окраски реактивов и опытные пробы растений из дистиллята и раствора металла.

Опытная проба:

- а. разбавленный супернатант – 1 мл
- б. медно-щелочной реактив – 1 мл
- в. рабочий раствор реактива Фолина – 4 мл

Контрольная проба:

- а. $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$ – 1 мл
- б. медно-щелочной реактив – 1 мл
- в. рабочий раствор реактива Фолина – 4 мл

Пробирки помещают на водяную баню при 55°C на 5 мин. Развитие окраски останавливают, погружая пробирки в холодную воду (10°C).

Оптическую плотность опытных проб измеряют против контрольной на спектрофотометре при длине волны 650 нм. Устройство спектрофотометра и правила работы с ним изложены в приложении.

В качестве эталонного вещества используют раствор альбумина (100 мкг/мл), разбавленный до концентраций: 80, 60, 40, 20, 10, 5 мкг/мл. Окрашивание разных концентраций белка (альбумина) проводят по той же схеме, что и опытных белков.

Представление результатов. Результаты должны быть представлены в виде таблицы

Образец	D_{650}	C, мкг/мл

Для перевода значения оптической плотности в значения концентрации строят калибровочный график по альбумину, по которому проводятся расчеты.

По оси ординат откладывают оптическую плотность (D), по оси абсцисс – концентрацию альбумина в мкг/мл (C).

Оптическая
плотность (D)



При расчете белков на 1 мл исходного супернатанта или 1 мг сырого (сухого) веса листьев необходимо учитывать разбавление, которое производят перед определением количества белков.

ПИГМЕНТНЫЙ КОМПЛЕКС РАСТЕНИЙ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ СОСТОЯНИЯ ВОДНОЙ (ВОЗДУШНОЙ) СРЕДЫ

Цель работы: определить содержание хлорофиллов и каротиноидов, диагностирующее состояние растения.

В связи с тем, что хлорофилл и другие пигменты растений являются необходимой составной частью фотосинтезирующей системы, нарушение их структуры или уменьшение их количества ведёт к значительному снижению фотосинтетической способности растений и как следствие – их роста. Снижение содержания хлорофилла часто используют в качестве индикаторной реакции повреждения, происходящего под действием загрязняющих воздух веществ (SO_2 , HF, тяжёлые металлы). При действии, например, SO_2 и HCl, которые подкисляют клеточную среду, происходит деградация хлорофилла на феофитин и Mg^{2+} , при этом магний заменяется двумя атомами водорода, что приводит к изменению спектральных характеристик хлорофилла. Не исключено, что поллютанты могут действовать на стабильность хлорофилл-белковых комплексов (например, тяжёлые металлы).

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ЭКСТРАКЦИИ ПИГМЕНТОВ

Пигменты могут быть экстрагированы из свежего и фиксированного материала. При выборе экстрагирующих веществ необходимо учитывать растворимость пигментов и возможность их выделения данным растворителем из пигментно-липо-протеидного комплекса, в виде которого пигменты находятся в пластидах.

В зависимости от химического строения различают растворители полярные (спирты, ацетон) и неполярные (петролейный эфир, гексан, бензин и др.). Степень полярности растворителя определяется величиной его дипольного момента.

Хлорофиллы и каротиноиды, являясь в основном липофильными соединениями, хорошо растворяются во всех растворяющих липиды соединениях: ацетоне, спирте, эфире, бензине, петролейном эфире и т.д.

Однако полное извлечение пигментов из растительного материала достигается только при использовании полярных растворителей или смесью полярных и неполярных растворителей. Полярные растворители, вызывая денатурацию белка и нарушая связи пигментов с липопротеидным комплексом, обеспечивают быструю экстракцию всех пигментов. Для выделения пигментов чаще всего используют 80%-ный ацетон или 90%-ный спирт.

Экстракцию проводят возможно быстрее. Пигменты экстрагируют последовательно несколькими порциями чистого растворителя, отделяя каждый раз раствор пигментов центрифугированием. При растирании навески листьев с растворителем необходимо добавлять небольшое количество CaCO_3 , MgCO_3 или 1н раствор NH_4OH для предотвращения разрушения пигментов.

Вся подготовительная работа с пигментами ведется в затемненном помещении, на холоду.

Методы работы. В ацетоновой вытяжке определяются количественно хлорофилл А, В и каротиноиды спектрофотометрическим способом.

Реактивы.

1. 80%-ный ацетон
2. CaCO_3 , MgCO_3 или 1н раствор NH_4OH

Оборудование.

1. Фарфоровые ступки и пестики
2. Мерные пробирки на 10 мл
3. Маркер по стеклу
4. Аналитические весы
5. Центрифуга
6. Спектрофотометр
7. Штатив для пробирок

Содержание работы

Навески свежего растительного материала (30 мг) в трех повторностях как для растений, выращиваемых на дистиллированной воде, так и для образцов из среды, содержащей металл тщательно растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством 80%-ного ацетона (1мл), чистого кварцевого песка и мела (или углекислого магния, или 1н раствора гидроксида аммония). Гомогенат переносят в предварительно пронумерованные центрифужные пробирки, обмывая ступку и пестик 2 мл ацетона и центрифугируют при 6-7 тысячах оборотов в течение 7 мин. Экстракт осторожно сливают в мерную пробирку на 10 мл. К осадку в центрифужной пробирке добавляют свежий 80%-ный ацетон, перемешивают раствор стеклянной палочкой и центрифугируют повторно. Надосадочную жидкость аккуратно сливают в соответствующую мерную пробирку с экстрактом, полученным после первого фильтрования и доводят объем вытяжки чистым растворителем до 7 мл. Полученная ацетоновая вытяжка содержит сумму зеленых и желтых пигментов.

Концентрация пигментов в вытяжке может быть определена на фотоэлектроколориметре по калибровочной кривой или непосредственно на спектрофотометре (СФ-26, СФ-46 и т.д.) с использованием для расчета концентрации пигментов соответствующих формул (Вернера, Арнона и др.). Устройство спектрофотометра и правила работы с ним изложены в приложении.

Для количественного определения часть полученного экстракта наливают в кюветку спектрофотометра. Вторая кювета заполняется чистым растворителем (80%-ным ацетоном). Кюветы помещают в кюветную камеру спектрофотометра и определяют оптическую плотность (D) при длинах волн, соответствующих максимумам определяемых пигментов.

Концентрация отдельных пигментов (хлорофиллов А и В) определяется двухволновым методом в общей смеси пигментов и сводится, таким образом, к следующему: с помощью спектрофотометра устанавливается величина оптической плотности (D) суммарной вытяжки пигментов при двух длинах волн, соответствующих максимумам поглощения пигментов в данном растворителе (в ацетоне – 665, 649).

Содержание суммы каротиноидов определяют в этой же вытяжке, измеряя величину оптической плотности (D) при длине волны 440,4 нм

Представление результатов. Показания спектрофотометра заносятся в таблицу

Образец	D _{440,5}	D ₆₄₉	D ₆₆₅

Концентрация пигментов рассчитывается по формуле Вернера.

$$C_A(\text{мг/л}) = 11,63 \cdot D_{665} - 2,39 \cdot D_{649};$$

$$C_B(\text{мг/л}) = 20,11 \cdot D_{649} - 5,18 \cdot D_{665};$$

$$C_A + C_B(\text{мг/л}) = 6,45 \cdot D_{665} + 17,72 \cdot D_{649}$$

Содержание суммы каротиноидов рассчитывается по формуле Веттштейна:

$$C_{\text{кар}}(\text{мг/л}) = 4,695 \cdot D_{440,5} - 0,268(C_{a+b} \text{ мг/л})$$

Установив концентрацию пигмента в вытяжке, определяют его содержание в исследуемом материале с учетом объема вытяжки и массы пробы:

$$A = C \cdot V / P \cdot 1000,$$

где C- концентрация пигментов в мг/л ,

V- объем вытяжки пигментов в мл;

A- содержание пигмента в растительном материале в мг/г свежего веса ;

P- навеска растительного материала в г.

Количество пигментов выражают в миллиграммах на единицу сырого или сухого веса, в % от сухого (сырого) веса, в миллиграммах на единицу площади листа (например, на дм^2).

Обычно в нормальных зеленых листьях содержание хлорофилла колеблется от 0,5 до 3 мг на 1 г свежего веса при отношении $A/B = 2,5-3$.

Содержание каротиноидов – 0,1-0,5 мг/г свежего веса.

РЕЗУЛЬТАТЫ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Цель работы: установить динамику некоторых показателей растений, выращиваемых на средах, содержащих тяжелые металлы и в контрольных условиях и выявить наличие влияния на них тяжелых металлов.

Студентам предлагается поставить монофакторный модельный эксперимент, позволяющий изучать влияние отдельно взятого металла на растение.

На протяжении 4-х недель каждые 7 дней у опытных (выращиваемых на среде, содержащей определенный металл) и контрольных (выращиваемых на дистиллированной воде) растений нужно определять следующие показатели их состояния:

- перекисное окисление липидов;
- содержание растворимых белков;
- содержание SH-групп в растворимых белках;
- содержание хлорофилла А, В и каротиноидов.

Методы работы. В основе работы лежит статистический метод обработки результатов, полученных в трех повторностях и математический метод подсчета ряда показателей состояния растений по полученным в ходе лабораторных исследований измерениям. Далее используется графический метод представления результатов и метод синтеза полученной информации.

Оборудование.

Персональный компьютер

Программа EXCEL

Содержание работы

1. Выбрать показатель для расчета (перекисное окисление липидов; содержание растворимых белков; содержание SH-групп в

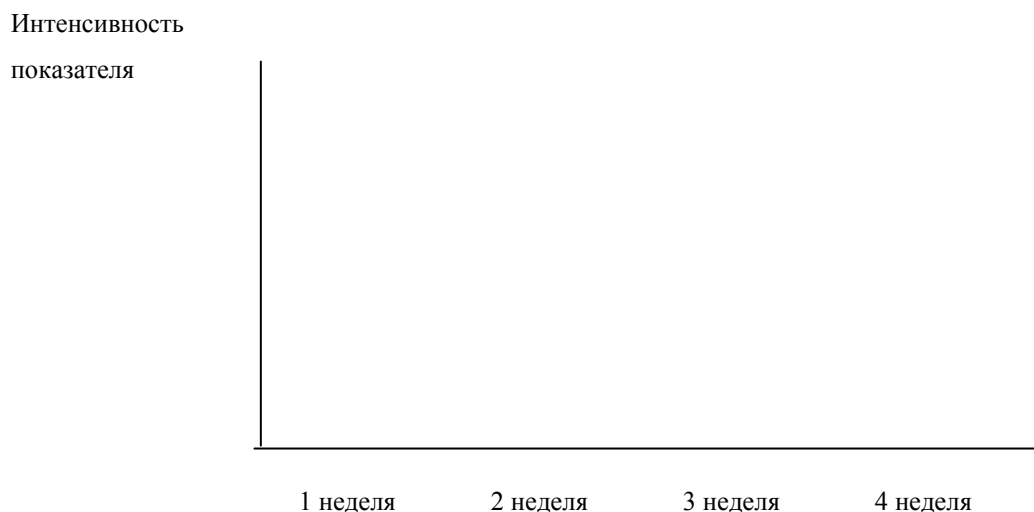
растворимых белках; содержание хлорофилла А, В и каротиноидов).

2. Собрать данные, полученные по 4-ем точкам по выбранному показателю.

3. Усреднить повторности.

4. Рассчитать исследуемый показатель для опытных и контрольных растений в каждой снятой временной точке.

5. В программе EXCEL нарисовать столбчатую диаграмму изучаемого показателя в одной системе координат для опытного и контрольного образца.



6. Установить динамику изучаемого показателя для растений, выращиваемых на среде, содержащей тяжелый металл по сравнению с растениями из контрольных условий.

7. Сделать вывод о характере влияния тяжелого металла на изучаемый показатель и объяснить возможный механизм.

8. Написать отчет по работе

ОЦЕНКА УРОВНЯ ЗАГРЯЗНЕННОСТИ ВОДЫ ПО СОДЕРЖАНИЮ В НЕЙ РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА

Цель работы: оценить уровень загрязненности воды по содержанию в ней кислорода.

Растворенный кислород находится в природной воде в виде молекул O_2 . На его содержание в воде влияют две группы противоположно направленных процессов: одни увеличивают концентрацию кислорода, другие уменьшают ее. К первой группе процессов, обогащающих воду кислородом, следует отнести:

1. процесс абсорбции кислорода из атмосферы
2. выделение кислорода водной растительностью в процессе фотосинтеза
3. поступление в водоём с дождевыми и снеговыми водами, которые обычно пересыщены кислородом.

К группе процессов, уменьшающих содержание кислорода в воде, относятся реакции потребления его на окисление органических веществ: биологическое окисление (дыхание растительных и животных организмов, расход кислорода на окисление органических веществ микроорганизмами) и химическое окисление (Fe^{2+} , Mn^{2+} , NO_2^- , NH_4^+ , CH_4 , H_2S).

Кроме того, уменьшение содержания кислорода в воде может происходить вследствие выделения его в атмосферу из поверхностных слоёв, но только в том случае, если вода при данной температуре и давлении окажется пересыщенной кислородом.

Концентрация кислорода определяет величину окислительно-восстановительного потенциала и в значительной мере направление и скорость процессов химического и биологического окисления органических и неорганических соединений. Кислородный режим оказывает глубокое влияние на жизнь водоёма. Минимальное содержание растворённого кислорода, обеспечивающее нормальное

развитие рыб составляет около $5 \text{ мг O}_2/\text{дм}^3$. Понижение его до $2 \text{ мг}/\text{дм}^3$ вызывает массовую гибель (замор) рыб.

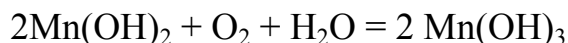
В соответствии с требованиями к составу и свойствам воды водоёмов у пунктов питьевого и санитарного пользования содержание растворённого кислорода в пробе, отобранной до 12 часов дня, не должно быть ниже $4 \text{ мг}/\text{дм}^3$ в любой период года; для водоёмов рыбохозяйственного назначения концентрация растворённого в воде кислорода не должна быть ниже $4 \text{ мг}/\text{дм}^3$ в зимний период (при ледоставе) и $6 \text{ мг}/\text{дм}^3$ – в летний.

Определение кислорода в поверхностных водах включено в программу наблюдений с целью оценки условий обитания гидробионтов, в том числе рыб, а также как косвенная характеристика оценки качества поверхностных вод и регулирования процесса очистки стоков. Она существенна для аэробного дыхания и является индикатором биологической активности (т.е. фотосинтеза) в водоёме.

Контроль за содержанием кислорода – чрезвычайно важная проблема, в решении которой заинтересованы практически все отрасли народного хозяйства, включая черную и цветную металлургию, химическую промышленность, сельское хозяйство, медицину, биологию, рыбную и пищевую промышленность, службы охраны окружающей среды.

Кислород является важным экологическим фактором, влияющим на развитие гидробионтов. В связи с этим анализ содержания кислорода является обязательным при проведении мониторинга за состоянием водных экосистем. Его содержание зависит от природных и антропогенных факторов. Недостаток кислорода приводит к заморным явлениям в зимний период, а также при массовом отмирании водорослей в результате «цветения» водоемов. Содержание растворенного кислорода в водоеме может характеризовать самоочищающую способность водоема.

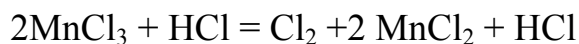
Методы работы. Сущность предлагаемого метода определения растворенного кислорода заключается в том, что гидрат закиси марганца в щелочном растворе окисляется за счет растворенного в воде кислорода с образованием гидрата окиси марганца



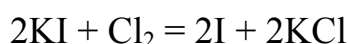
После растворения в соляной кислоте гидрат окиси марганца образует хлорный марганец



Хлорный марганец легко распадается с выделением свободного хлора



В присутствии йодистого калия свободный хлор выделяет из него эквивалентное количество йода



Следовательно, 2 атома йода эквивалентны одному атому кислорода. Количество выделившегося йода оттитровывается гипосульфитом.

Реактивы.

1. Раствор хлористого марганца, содержащий 42,5 г $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ или 48 г $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, доводят до 100 мл дистиллированной водой.
2. Щелочной раствор йодистого калия готовят, растворяя 70г КОН или 50г NaOH и 15 г KI в дистиллированной воде, и доводят объем до 100 мл.
3. Химически чистую соляную кислоту разводят дистиллированной водой в отношении 1:1 по объему или химически чистую серную кислоту 1:3 по объему.
4. Тиосульфат, 0,02N, раствор готовят разбавлением 0,2N раствора, приготовленного из фиксанала. Каждый миллилитр 0,02N раствора $\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_3$ эквивалентен 0,16 мг кислорода.

5. 5% раствор крахмала. Дистиллированную H_2O доводят на плитке до горячего состояния. Затем при постоянном перемешивании стеклянной палочкой (во избежание образования комков) всыпают в нее крахмал, доводят раствор до кипения и охлаждают.

Оборудование.

1. Конические колбочки с притертыми пробками на 100 мл или конические узкогорлые колбочки и резиновые пробки
2. Мерные колбы на 25 мл, 50, 100 мл
3. Весы технические
4. Штатив, бюретка
5. Электроплитка
6. Маркер по стеклу

Содержание работы

Вода из водоема берется с соответствующей глубины батометром Руттнера. При наполнении склянок к крану батометра присоединяют резиновую или стеклянную трубку, которая опускается через горлышко до дна склянки. Следят, чтобы не проскакивало через воду пузырьков воздуха. Воде дают переливаться через верх склянки так, чтобы сменилось 2-3 объема. Склянки для анализа берут примерно одного объема 120-140 мл.

После полного заполнения колбы водой в нее тотчас же, погрузив пипетку до самого дна колбы, вносят по 0,5 мл раствора сернокислого марганца и щелочного раствора йодистого калия, при этом небольшое количество воды из колбы перельется. Колбу закрывают притертой пробкой так, чтобы под ней не осталось пузырька воздуха, и содержимое склянки тщательно перебалтывают. Дают осадку осесть, примерно в течение 30 минут.

После этого вводят 1 мл серной или соляной кислоты, закрывают склянку пробкой и тщательно перебалтывают так, чтобы осадок полностью растворился. Берут в двух повторностях по 50 мл жидкости, определяют количество выделившегося йода титрованием 0,02Н гипосульфитом в присутствии крахмала (5 капель) до обесцвечивания раствора.

Представление результатов. Расчет растворенного кислорода выводится по формуле:

$$x = 0,16 F \cdot n \cdot 1000 / V_1 - V_2,$$

где x – количество кислорода в мг на 1 л воды;

n – количество минут раствора гипосульфита, пошедшего на титрование, в мл;

F - поправка на титр 0,02Н гипосульфита;

V_1 – объем воды в склянке, в мл;

V_2 – объем взятых реактивов.

Расчеты показывают, что если объемы склянок, взятых для серийных определений кислорода, колеблются не более 20 мл, в пределах от 120 до 140 мл, то можно титровать не весь объем склянки, а скажем по 50 или 100 мл. При этом ошибка из-за неравности объемов не превышает 0,25%, а массовые расчеты результатов очень упрощаются и могут проводиться в случае 50 мл титруемой жидкости по следующей формуле:

$$x = 0,16 \cdot F \cdot n \cdot 1000 / 49,6 = 3,22 \cdot F \cdot n \text{ (мг O}_2 \text{ на 1 л)}.$$

На основании данных, приведенных в таблице, оцените уровень загрязненности проанализированной воды по содержанию в ней кислорода.

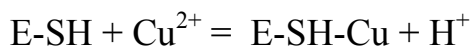
Уровень загрязнённости воды и класс её качества	Лето, мгО ₂ /дм ³	Зима, О ₂ /дм ³ мг	% насыщения
Очень чистые, I кл	9	14-13	95
Чистые, II кл	8	12 – 11	80
Умеренно загрязнённые, III кл	7-6	10-9	70
Загрязнённые, IV кл	5-4	5-4	60
Грязные, V кл	3-2	5-1	30
Очень грязные, VI кл	0	0	0

ТЕСТ НА ЗАГРЯЗНЕНИЕ ВОДЫ (ПОЧВЫ) ИОНАМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Цель работы: провести тест воды (или почвы) на загрязнение тяжелыми металлами.

В связи с развитием работ по биоиндикации компонентов биоценозов актуальными стали вопросы о комплексном тестировании загрязнения и поиска быстрых тест-систем. Настоящая работа позволяет использовать реакцию растений на ионы тяжёлых металлов (например, меди, свинца, тория, кобальта, цинка, бария и других) в качестве биотеста.

Ионы металлов необратимо связываются с SH-группами остатков цистеина, а поэтому нарушается каталитическая активность ферментов. Они ингибируют их с образованием меркантидов:



То есть возникает неконкурентное ингибирование, в результате чего клетка погибает.

Методы работы. Оценка состояния воды осуществляется на основании подсчета окрашенных мертвых клеток в растительных тканях, количество которых сравнивается с контрольным вариантом.

Реактивы.

Раствор CuSO_4 (или соль другого тяжелого металла) с концентрацией катиона 25 мг/л. Растворы с меньшими концентрациями катиона готовят путем разбавления исходного раствора.

Краситель сафранин (спиртовой раствор). 250 мг сафранина растворяют в 100 мл 10% спирта.

Оборудование.

1. Мерные пробирки на 10 мл
2. Маркер по стеклу
3. Мерная пипетка или дозатор

4. Трубчатое сверло (для листьев наземных растений)
5. Центрифуга
6. Чашки Петри
7. Таймер
8. Предметные и покровные стекла
9. Световой микроскоп
10. Штатив для пробирок

Содержание работы

Отработку теста можно осуществлять в модельных опытах в лабораторных условиях. Введение меди (равно как и других ионов: свинца, тория, бария и т.д.) в растительные ткани в эксперименте можно осуществлять методом инфильтрации, т.е. введением растворов, содержащих ионы, в межклетники тканей листа. Ниже приведено описание работы с ионами меди. Для других ионов работа проводится по той же схеме.

Использование водных растений

В центрифужные пробирки с растворами CuSO_4 (концентрация катиона 0.01; 0.025; 0.1; 0.25 мг /л) поместить по 10 неповрежденных листьев элодеи или дисков другого растения. В качестве контроля использовать вариант с дистиллированной водой. Центрифугировать 10 мин при 5000 об/мин, затем резко остановить центрифугу.

Инфильтрованные листья поместить в чашки Петри на увлажнённые дистиллированной водой бумажные фильтры, прикрыть крышками и поставить под лампу или на освещённое окно.

Наблюдения проводить через 15, 30, 60, 120 минут после выдерживания инфильтрованных листьев на свету. Действие ионов металлов должно проявиться в гибели клеток. Живые клетки очень ограничивают проницаемость внутрь органических веществ и, помещённые в раствор красителя, практически не окрашиваются. В

мёртвые клетки краска проникает свободно, благодаря чему их можно сразу обнаружить и учесть.

Для окрашивания используют спиртовой раствор красителя сафранина, поскольку он обладает способностью хорошо окрашивать стенки клеток. Образцы выдерживают в красителе 3 – 5 минут, затем пинцетом прополаскивают листья в стакане с дистиллированной водой для удаления избытка красителя. На каждом листочке просматривают 3 поля клеток, в каждом из них считают общее количество клеток и количество окрашенных, т. е. мертвых клеток.

За показатель токсичности поллютанта (ионов металлов) принимают количество окрашенных клеток в процентном отношении к общему количеству клеток в поле зрения микроскопа.

Проведение теста на высших растениях

10 – 15 листьев или дисков листа помещают в центрифужные пробирки с растворами CuSO_4 (использовать те же концентрации, что и для элодеи). С листьями необходимо обращаться очень аккуратно, избегая их механического повреждения.

Для успешного осуществления инфильтрации листья необходимо погрузить в инфильтруемый раствор, для этого внутрь центрифужной пробирки на листовые диски помещают небольшой груз (например, кусочек стеклянной палочки или небольшую центрифужную пробирку, которая придавит листья ко дну). Центрифугируют в течение 10 минут при 7000 оборотах в мин. Инфильтрованные листья выглядят более тёмными. После инфильтрации листья поместить в чашки Петри на смоченные водой фильтры, накрыть крышками и оставить на освещённом окне на 24 – 48 часов.

По истечении указанного времени диски окрашивают сафранином, как было описано выше. Образец выдерживают в красителе 15 минут. Из средней части диска (без крупных жилок) делают поперечные срезы толщиной в 1-2 клетки, выбирают наиболее удачный

и определяют под микроскопом количество окрашенных клеток и общее количество клеток поперечного среза листа.

За показатель токсичности поллютанта (ионов металлов) принимают количество окрашенных клеток в процентном отношении к общему количеству клеток поперечного среза листа.

Представление результатов. Результаты заносятся в таблицу.

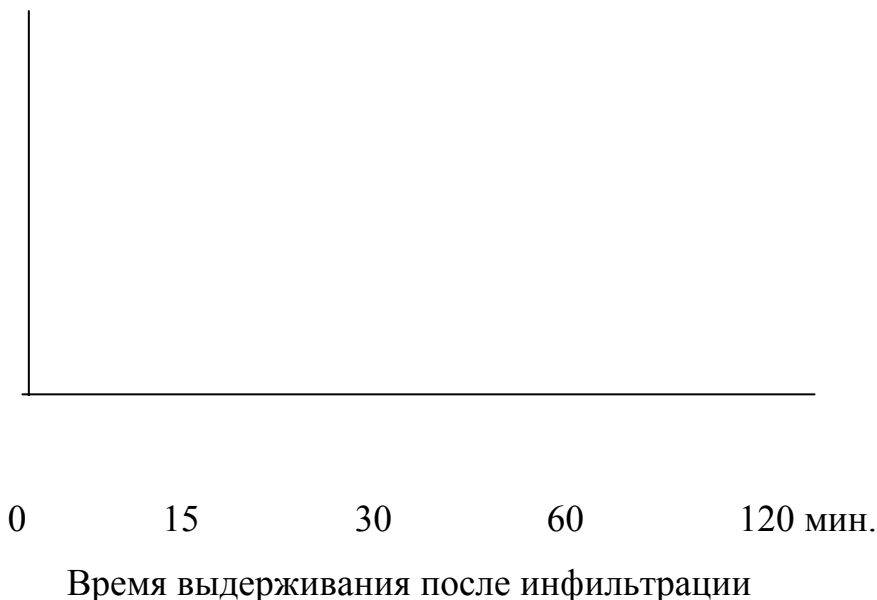
Концентрация раствора	Количество поврежденных клеток в поле	Общее количество клеток в поле	% окрашенных клеток (среднее значение)

Далее по ним строятся графики для каждой концентрации поллютанта в одной системе координат.

Процент

повреждённых

клеток



Делается вывод о действии ионов тяжелых металлов на листья растений.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ СОДЕРЖАНИЯ НИТРАТ-ИОНОВ В РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ (ВОДЕ) НОРМАТИВАМ КАЧЕСТВА

Цель работы: установить соответствия содержания нитрат-ионов в растительной ткани (воде) существующим нормативам качества.

В настоящее время одной из важных проблем, возникающих как результат усиления антропогенной нагрузки на экосистемы, является проблема нитратов. Наряду с традиционным решением задач использования нитратного азота как источника азотного питания растений и оптимизации эколого-агрохимических условий, влияющих на формирование урожая и его качество, возникли вопросы экологических последствий аккумуляции нитратов в почве, воде, растениях, атмосфере, влияние их на здоровье человека.

Нитраты – неотъемлемая часть всех наземных и водных экосистем, поскольку процесс нитрификации, ведущий к образованию окисленной неорганической формы азота, является принципиальным механизмом, имеющим глобальный характер. В то же время с ростом интенсификации производства вообще и азотных удобрений, в частности, поступление неорганических соединений азота в природные воды, растения, а следовательно, и в организм человека все возрастает. По этой причине проблема загрязнений растениеводческой продукции нитратами, избыточное потребление которых может привести к ряду серьезных заболеваний, приобрела такую остроту в настоящее время.

Методы работы. В основу предлагаемого метода положен принцип зависимости электродвижущей силы (ЭДС) гальванического элемента ионоселективного электрода от концентрации ионов в растворе. (Метод применяется в случае, если содержание хлорид-ионов в пробе не превышает содержание нитрат-ионов более чем в пятьдесят раз. Чувствительность метода 6 мг/дм).

Для проведения работы используется интегральный измерительный прибор – Ph-метр/иономер (Анион 410). Прибор преобразует значение ЭДС в значение Ph (Рх) при помощи метода градуировочного графика, который автоматически строится процессором прибора, на основе введенных в него значений ЭДС стандартных растворов

Реактивы

1. 1% раствор алюмокалиевых квасцов

Оборудование

1. Трубчатое сверло
2. Фарфоровые ступки и пестики
3. Капроновая ткань и воронка (или центрифуга)
4. Конические колбы или стаканы на 100 мл
5. Маркер по стеклу
6. Технические весы
7. Иономер «Анион 410»

Содержание работы

1. Подготовка пробы к анализу

Для проведения анализа свежую (обводненную) навеску в 1 г (с точностью до второго десятичного знака) или высушенную – 12,5 г растительной ткани тщательно растирают в ступке. Если ткань жесткая, для гомогенизации можно добавить измельченное стекло. Для проведения сравнения необходимо как минимум две пробы из разных участков анализируемого объекта. Например, если это картофель, можно взять пробу из области сердцевины и из периферийной части (удобно при помощи трубчатого сверла). Если его нет, можно сделать радиальный срез и взять пробы из разных точек радиуса.

После гомогенизации пробу перенести в коническую колбу или стакан на 100 мл, для чего в ступку порциями добавляется 1% раствор алюмокалиевых квасцов (1г на 100 мл воды) так чтобы смыть в колбу весь гомогенат. Если проба сухая, то можно добавить раствор уже при

растирании. Конечный объем добавленного раствора должен равняться 50 мл (это необходимо помнить, если вы добавили раствор при растирании). Колбу закрывают пробкой и перемешивают содержимое встряхиванием в течение трёх минут (если используется стакан, можно перемешать палочкой).

Подготовленный таким образом гомогенат необходимо профильтровать через плотную капроновую ткань или бумажный фильтр. Его можно также центрифугировать при 7000 оборотах в течение 5 – 7 минут. Полученный фильтрат используют для определения нитратов. Потенциометрическим методом с помощью прибора «Анион 410». О подготовке прибора к работе и проведению измерений смотрите в приложении.

Определение NO_3^- в воде проводят так же, как в экстракте из растительной ткани. Прибор сразу показывает содержание нитрат-ионов в мг/л.

Представление результатов. Занесите показания прибора в таблицу

Растение	Часть органа растения	NO_3^- , мг/л

Пересчитайте полученные значения содержания нитрат-ионов в мг/кг сырой массы. На основании данных, приведенных в таблице, оцените соответствие содержания нитратов в исследованных растениях нормативам.

*Пределы содержания нитратов в товарной части урожая
сельскохозяйственных растений*

<i>Вид растения</i>	<i>NO₃⁻, мг/кг сырой массы</i>	<i>Вид растения</i>	<i>NO₃⁻,мг/кг сырой массы</i>
Арбуз	40 – 600	Патиссоны	160 – 900
Баклажаны	80 – 270	Перец сладкий	40 – 330
Горошек зелёный	20 – 80	Петрушка	1700 – 2500
Дыня	40 – 500	Редька чёрная	1500 – 1800
Капуста кочанная	600 – 3000	Редис	400 – 2700
Кабачки	400 – 700	Салат	400 – 2900
Картофель	40 – 980	Свёкла	200 – 4500
Лук зелёный	40 – 1400	Томаты	300 – 1300
Лук репчатый	60 – 900	Укроп	400 – 2200
Морковь	160 – 2200	Чеснок	40 – 300
Огурцы	80 – 560	Щавель	240 – 400

ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ОКИСИ УГЛЕРОДА В АТМОСФЕРЕ ВОЗДУХА ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ПОМЕЩЕНИЙ

Цель работы: измерение концентрации окиси углерода в атмосфере различных помещений и установление соответствия нормативам качества воздуха.

Методы работы. Метод измерения концентрации окиси углерода в воздухе основан на анализе газов путем электролиза при постоянном потенциале. Поступающий в газоанализатор воздух продувается при помощи насоса через фильтр, исключающий попадание в электрохимическую ячейку частиц пыли, а затем подается собственно в электрохимическую ячейку, заправленную серной кислотой. В ячейке происходит электролиз, результатом которого является изменение силы протекающего через нее тока, что фиксируется и обрабатывается измерительным устройством. После декодирования сигнал попадает на аналоговый цифровой преобразователь, откуда идет на цифровой индикатор.

Оборудование.

1. Газоанализатор «ПАЛЛАДИЙ – 3» с комплексом соединительных трубок
2. Полиэтиленовые емкости (не менее 3-х литров) для отбора проб, снабженные зажимами и переходниками
3. Ручной насос с соединительными трубками в комплекте

Содержание работы

Отбор проб производится путем нагнетания воздуха, предназначенного для анализа, при помощи ручного меха или насоса в полиэтиленовую емкость. После наполнения емкости примерно тремя литрами воздуха (запрещается наполнять емкость до отказа), выходной шланг пережимается зажимом, что исключает потерю пробы при ее

транспортировке. После того, как необходимые пробы отобраны, можно приступить к их анализу.

Подготовка прибора

1. Для начала работы прибор необходимо включить в розетку 220 В, нажать на кнопку переключения сети «СЕТЬ», находящуюся на передней панели прибора (при этом должен загореться зелёный светодиод), и прогреть его в течение 30 минут.
2. Проверить наличие и исправность системы, отводящей анализируемый газ из прибора вне помещения (трубка должна быть присоединена к выходному штуцеру, находящемуся на передней панели и имеющему маркировку в виде направленной вверх треугольной стрелочки, и выведена на улицу).

Проведение анализа

- Перед проведением анализа необходимо присоединить при помощи переходника емкость, содержащую пробу, к трубке, сообщающейся со входным штуцером прибора (этот штуцер имеет маркировку в виде треугольной стрелочки, направленной вниз). После чего необходимо разместить емкость с воздухом так, чтобы на неё не было никаких давящих воздействий снаружи.
- Открыть зажим на выходном патрубке емкости с испытуемым воздухом.
- Нажать кнопку включения побудителя расхода воздуха «НАСОС», находящуюся на передней панели прибора (при этом поплавков-индикатор подачи газа, находящийся в окошке, должен разместиться своим основанием на уровне риски).
- После стабилизации показаний прибора необходимо их зафиксировать в отчете о проведенной работе, придав им значение мг СО/м³.

После окончания работы необходимо отключить кнопкой «СЕТЬ» питание прибора (при этом должен погаснуть зелёный светодиод) и выключить его из розетки.

Представление результатов. Результаты работы должны быть представлены в виде нижеприведенной таблицы и сделанных по ней выводов о соответствии нормативам качества воздуха.

ПДК по СО (оксиду углерода):

Максимальная = 5 мг / м³ Среднесуточная = 3 мг /м³

Проба воздуха	Содержание СО в мг/м ³

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕДИ МЕТОДОМ ИНВЕРСИОННОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ С ГРАФИТОВЫМ ЭЛЕКТРОДОМ

Цель работы: установить соответствия содержания меди в различных водоемах существующим нормативам качества.

Медь – один из важнейших микроэлементов. Физиологическая активность меди связана главным образом с включением ее в состав активных центров окислительно-восстановительных ферментов. Недостаточное содержание меди в почвах отрицательно влияет на синтез белков, жиров и витаминов и способствует бесплодию растительных организмов. Медь участвует в процессе фотосинтеза и влияет на усвоение азота растениями. Вместе с тем, избыточные концентрации меди оказывают неблагоприятное воздействие на растительные и животные организмы.

Содержание меди в природных водах колеблется от 2 до 30 мкг/дм³, в морских водах – от 0,5 до 3,5 мкг/дм³. Основным источником поступления меди в природные воды являются сточные воды предприятий химической, металлургической промышленности, шахтные воды. Медь может появляться в результате коррозии медных трубопроводов и других сооружений, используемых в системе водоснабжения. В подземных водах содержание меди обусловлено взаимодействием воды с горными породами, содержащими её.

Предельно допустимая концентрация меди в воде водоёмов санитарно-бытового водопользования составляет 0,1 мг/дм³, в воде рыбохозяйственных водоёмов - 0,001 мг/дм³.

Методы работы. В основе инверсионной вольтамперометрии амальгамообразующих металлов лежит концентрирование определяемого металла на поверхности ртутно-графитового электрода в результате предварительного электролиза анализируемого раствора при потенциале предельного диффузного тока. Образующийся в процессе

накопления на электроде концентрат (амальгама металла) подвергается анодному превращению и прибор регистрирует величину максимального тока электрорастворения осадка металла.

Методика позволяет измерять массовую концентрацию ионов меди в природных водах в диапазоне от 0,5 до 30 мкг на л при содержании в пробе органического углерода менее 10 мг на л. Мешающее влияние органических веществ устраняется мокрым сжиганием.

Реактивы.

1. Фоновый электролит – 2 М раствор HCl
2. Раствор $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ концентрацией 1 г / л

Оборудование.

1. Пробирки мерные на 10 мл
2. Штатив для пробирок
3. Маркер по стеклу
4. Весы аналитические
5. Комплект экологического контроля «ИВА – 3»

Точность метода зависит в большой степени от точности приготовления концентрации растворов $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ и стандартных добавок Cu^{2+} , а также от точности взятия объемов растворов

Содержание работы

1. Включить прибор «ИВА -3» и графопостроитель в розетку и нажать кнопки «СЕТЬ» на их корпусах. Прогреть приборы в течение 15 мин.
2. *Подготовка ячейки.* Ячейка должна быть предварительно залита дистиллированной водой. Дистиллят необходимо слить и поместить во внутренний стакан-мешалку. Провод, идущий от ячейки, присоединить к разъему «ВСП» коллектора входов.
3. *Подготовка рабочего электрода.* Рабочий электрод должен храниться в сухом состоянии. Перед работой его необходимо

смочить дистиллятом и пришлифовать на фильтре так, чтобы внутренний электрод (смотри с торца) блестел. Электрод подключается к разъему «РАБ» на коллекторе входов (включается последним).

4. *Подготовка электрода сравнения.* Электрод сравнения в насыщенном растворе KCl (заполняется им же) с закрытой резиновой пробочкой. Шнур электрода с биркой присоединить к разъёму «СРАВ», а шнур без бирки к разъёму « ⊥ » коллектора входов.

5. *Подготовка графопостроителя.*

- Установка бланка производится при зажатых кнопках. «БЛАНК» и «ПЕРО». Бланк необходимо установить так, чтобы его широкая белая полоса оказалась под роликами, а два светящихся светодиода оказались на одной полосе бланка. После установки бланка следует нажать на кнопки, расположенные с торцов поднимающих ролики красных кнопок.
- Отжать кнопку «БЛАНК».
- Установить перо так, чтобы его кончик находился на 1 мм выше плоскости бланка.
- Установка нуля. Для установки точки, которая будет считаться нулём отсчёта по оси X (Y) необходимо зажать кнопку «НУЛЬ» по соответствующей оси и ручкой, находящейся слева от кнопки, установить искомое место на бланке. После чего кнопку «НУЛЬ» необходимо отжать.

6. *Подготовка прибора «ИВА-3».* Для подготовки прибора необходимо правильно установить все органы управления прибором.

$$U_{H1} = 0$$

$$T_{H1} = 0$$

$U_{H2} = 100$ - потенциал накопления, что соответствует $-1,00$ В

$T_2 = 1$ - время накопления 1 минута

$U_K = 0$ - конечный потенциал 0 В

$V = 5$ - $\times 50$, что соответствует скорости развёртки потенциала от U_2 до U_K 250 МВ/сек

Чувствительность - 1

Род работы

___ Р (зажатая кнопка) работа

___ Д (отжатая) дифференциальное отображение результатов

___ А (отжатая) анодная развёртка

___ руч (отжатая) ручная работа

На графопостроителе:

Вход ось X > 50 Вход ось Y < 50

Масштаб ось X = 200 мВ/см ось Y = 5 мВ/см

7. Непосредственное измерение

В центральный стакан ЭХЯ (электрохимической ячейки) наливают 9.5 мл раствора 2 М HCl и 0.2 мл раствора $Hg(NO_3)_2$ – концентрацией 1 г /л. Вспомогательные емкости ЭХЯ заполняют раствором 2 М HCl. После заполнения и подключения ячейки следует нажать кнопку «ПУСК».

Холостой опыт следует проводить для того, чтобы исключить содержание Cu^{2+} в используемых реактивах.

При измерении растворов, содержащих Cu, Pb, Cd, графопостроитель выдает следующую кривую. Пик А в районе развертки при $U = -0,2$ В соответствует меди, пик В (при $-0,4$ В) соответствует Pb, пик С ($-0,6$ В) соответствует Cd. Величина пика должна составлять не более 5 см. При большем размере раствор следует разбавлять в кратное число раз и повторить анализ.

Концентрацию меди в исходном растворе определяют методом стандартных добавок. Для этого после получения исходного сигнала от

раствора к нему добавляют раствор меди известной концентрации, после чего повторно снимают показания прибора.

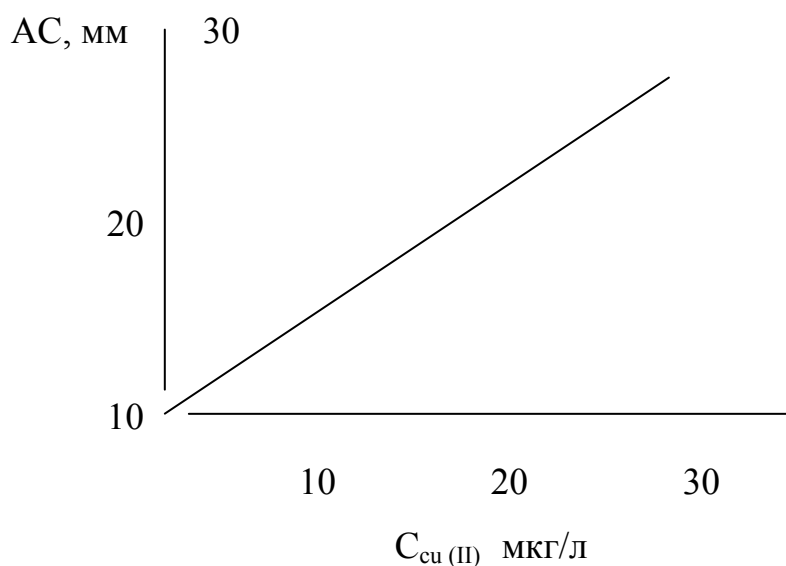
При этом измеряют величину пика А (АС на графике) в сигнале пробы H_1 , и величину пика в сигнале проба + добавка H_2 . Концентрацию меди рассчитывают по формуле:

$$C_{Cu} = \frac{H_2 - H_1}{V_{ячейки}} \cdot \frac{C_g \cdot V_g}{V_{яч.}}, \quad \text{где } C_g - \text{концентрация добавки}$$

$$V_g - \text{объем добавки}$$

$$V_{яч.} - \text{объем раствора в ячейке}$$

Количество и концентрацию добавки определяют следующим образом:



Далее приводится вспомогательная таблица для определения разбавления пробы и добавки.

Диапазон измерения Cu^{2+}	Разбавление пробы	Добавка, г/л Cu^{2+}	
0.5 – 1.0	-	0.5 мл	$1 \cdot 10^{-5}$
1.0 – 5.0	-	0.2 мл	$1 \cdot 10^{-4}$
5 – 10	-	0.5 мл	$1 \cdot 10^{-4}$
10 – 30	1 : 5	0.3 мл	$1 \cdot 10^{-4}$

ПРИМЕЧАНИЕ: *Перед заливкой в ячейку других растворов её необходимо промыть дистиллированной водой и ополоснуть фоновым электролитом. Графитовый электрод помимо полировки перед новыми блоками измерений на фильтре, через каждые 6 – 8 блоков измерений необходимо шлифовать на шкурке 00, а затем на смоченном фильтре.*

Представление результатов. Результаты работы должны быть представлены в виде приведенной таблицы и вывода о соответствии содержания тяжелых металлов в различных водоемах существующим нормативам качества.

Источник воды	Содержание ионов тяжелых металлов, мг/дм ³		
	Медь	Кадмий	Торий

ВЫЯВЛЕНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОЗДУХА СОЕДИНЕНИЯМИ СЕРЫ ПО СОДЕРЖАНИЮ СУЛЬФАТОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Сера является биогенным элементом. Растениям наиболее доступна сульфатная форма серы, содержащейся в почве, которая составляет 10-25% от общего ее содержания.

Антропогенный вклад соединений серы в экосистемы составляет примерно половину от природных источников, а на урбанизированных территориях существенно превышает его. При сжигании любого вида топлива в атмосферу поступает сера в виде оксидов SO_2 и SO_3 , поэтому любая деятельность человека, связанная с огневыми технологиями, сопровождается загрязнением в первую очередь воздуха соединениями серы. В результате последовательных реакций с компонентами атмосферы оксиды превращаются в ионы SO_4^{2-} .

Для оценки загрязнения воздуха соединениями серы удобно использовать пористые части растений (например, кору сосны как широко распространенного вида), которые механически адсорбируют их. Фоновое содержание SO_4^{2-} в коре для сосновых сообществ северо-западной территории России составляет 100-300 мг/кг.

Цель работы: сравнить загрязненность воздуха разных территорий соединениями серы на основании содержания сульфатов в растениях.

Методы работы. Суть турбидиметрического метода сводится к тому, что определяемый компонент переводят в форму взвеси малорастворимого соединения и измеряют ослабление светового потока.

Метод определения содержания сульфатов основан на реакции взаимодействия сульфат-ионов водной вытяжки растительной ткани с ионами бария $\text{Ba}^{2+} + \text{SO}_4^{2-} = \text{BaSO}_4\downarrow$, в результате которой происходит помутнение раствора. Интенсивность ослабления света определяется на спектрофотометре.

Реактивы.

1. 20% раствор BaCl_2

2. Раствор K_2SO_4 с концентрацией сульфат-иона 1000 мг/л. Для этого на аналитических весах берут навеску 0,1814 г сульфата калия, помещают в мерную колбу на 100 мл, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Раствор хранят в стеклянной колбе с притертой пробкой в течение месяца. Затем путем разбавления исходного раствора готовят раствор сульфата калия с концентрацией сульфата 100 мг/л общим объемом 100 мл, а уже из него делают раствор сульфата калия с концентрацией сульфата 25 мг/л. Последний раствор не подлежит хранению и каждый раз готовится свежий.

Из раствора сульфата калия с концентрацией сульфата 25 мг/л путем разбавления готовят растворы для построения градуировочной шкалы с концентрациями сульфата 0, 1, 2, 3, 4, 5 мг/л. Для этого в мерные колбы на 25 мл вносят соответственно 0, 1, 2, 3, 4, 5 мл раствора с концентрацией сульфата 25 мг/л, добавляют в каждую колбу по 5 мл 20% раствора BaCl_2 и нагревают на водяной бане до 50-60°. Пробы охлаждают, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

Оборудование.

Стаканчики на 50-100 мл

Маркер по стеклу

Воронки, фильтры

Пипетки мерные

Мерные колбы на 25 и 100 мл

Водяная баня

Спектрофотометр

Содержание работы

Кору сосны, собранную на участках различного антропогенного загрязнения, измельчают с помощью механической мельницы или пестиком в ступке и просеивают через сито с диаметром отверстий 1 мм.

На технических весах берут навеску перемолотого растительного материала, равную 1 г, помещают в стаканчик. Приливают мерной колбой 25мл дистиллированной воды, стараясь полностью смочить частички коры и оставляют на сутки.

Вытяжку фильтруют и отбирают в мерные колбы на 25 мл две аликвоты по 5 мл. Вторая служит для определения фонового поглощения, т.е. является контролем к опыту. В первую колбу приливают 5 мл 20% раствора BaCl_2 , во вторую – такое же количество дистиллята. Для ускорения реакции соосаждения колбы нагревают на водяной бане до $50-60^{\circ}\text{C}$, после чего доводят объем дистиллятом до метки.

Оптические плотности опытных растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 нм против водного экстракта образца без добавления бария хлористого для исключения фонового окрашивания за счет пигментов исследуемого материала.

Оптические плотности калибровочных растворов проводят на спектрофотометре при длине волны 410 нм против дистиллированной воды. Градуировочный график строят каждый раз при определении сульфатов в опытном материале. По оси ординат откладывают оптическую плотность (D), по оси абсцисс – концентрацию сульфатов мг/л (C).

Оптическая

плотность (D)



Концентрация мг/л (C)

Представление результатов. Результаты должны быть представлены в виде таблицы

Образец	D ₄₁₀

Затем значения оптической плотности переводят в значения концентрации сульфатов в экстрактах по калибровочному графику.

Содержание сульфатов в образцах рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{C_{\text{гр.}} V_1 V_2}{V_3 a}$$

где C – концентрация сульфатов в пробе, мг/кг;

C_{гр.} – концентрация сульфатов в пробе, найденная по калибровочной кривой, мг/л;

V₁ – объем мерной колбы, используемой при разбавлении калибровочного раствора, мл;

V₂ – объем, используемый при приготовлении водной вытяжки, л;

V₃ – аликвотный объем пробы, мл;

a – навеска, кг.

Сравнивается степень загрязнения воздуха исследуемых участков оксидами серы.

УСТАНОВЛЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ НОРМЕ СОДЕРЖАНИЯ СВИНЦА В ВОДЕ РАЗЛИЧНЫХ ВОДОЕМОВ

Цель работы: установить содержание свинца в воде различных водоемов и соотнести его с нормативным.

Свинец является одним из основных загрязнителей окружающей среды и относится к первому классу опасности. Он обладает способностью поражать центральную нервную систему, костный мозг и кровь, сосуды, генетический аппарат, нарушает синтез белка, вызывает малокровие и параличи. Большая концентрация свинца тормозит биологическую очистку сточных вод. Основными источниками загрязнения свинцом являются выхлопные газы автотранспорта и сточные воды различных производств. Допустимая концентрация свинца в воде – 0,03 мг/л.

Методы работы. Бихромат- и хромат-ионы образуют с ионами свинца малорастворимый хромат свинца желтого цвета.



Количество образовавшегося осадка сравнивается с приготовленной стандартной шкалой, по которой рассчитывается концентрация ионов свинца.

Реактивы.

1. Буферный раствор. Для приготовления буферного раствора 1,9 г гидротартата натрия $\text{NaHC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ и 1,5 г винной кислоты $\text{H}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ растворить в 100 мл дистиллированной воды, отмеренной мерной колбой.
2. 10% раствор бихромата калия
3. Стандартный раствор, содержащий 0,1 мг свинца в 1 мл раствора.
Для приготовления стандартного раствора 0,032 г $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ растворить в 200 мл дистиллированной воды, отмеренной мерной колбой.
4. Раствор HNO_3 разбавленной 1 : 2.

5. 0,5% раствор ацетата натрия CH_3COONa

6. 50% раствор CH_3COOH

Оборудование.

1. Мерные колбы на 100 и 200 мл.
2. Пробирки
3. Штативы для пробирок
4. Фарфоровые чашки
5. Маркер по стеклу
6. Пипетки (дозаторы)
7. Водяная баня (электроплитка)

Содержание работы

Пробы воды, отобранной в разных водоемах объемом 0,5 л предварительно упарить на плитке или кипящей водяной бане до объема 10 мл.

К полученной пробе прилить 5 мл раствора азотной кислоты, разбавленной 1 : 2, нагреть на кипящей водяной бане в течение 15 минут, отфильтровать и выпарить в фарфоровой чашке. К сухому остатку прилить 2 мл 0,5% раствора ацетата натрия и 8 мл дистиллированной воды. Раствор перемешать и отфильтровать в пробирку.

Подготовить стандартную шкалу, используя раствор, содержащий 0,1 мг ионов свинца в 1 мл. Для приготовления серии разбавлений следует воспользоваться таблицей.

№ пробирки	0	1	2	3	4	5
Стандартный раствор, мл	0,00	0,05	0,10	0,30	0,50	0,80
0,5% раствор CH_3COONa , мл	Во все пробирки по 2 мл					
H_2O дистиллированная, мл	8,00	7,95	7,90	7,70	7,50	7,20
Содержание свинца, мг/мл	0,00	0,005	0,010	0,030	0,050	0,080

Во все пробирки стандартной шкалы и в пробирку с пробой внести по 1 мл 50% раствора CH_3COOH и перемешать. Добавить по 0,5 мл 10% раствора бихромата калия, пробирки встряхнуть и через 10 минут приступить к определению. Содержимое пробирок рассматривать сверху на черном фоне, верхнюю часть пробирок до уровня жидкости прикрыть со стороны света картоном. Найти среди пробирок с растворами для стандартной шкалы наиболее близкую по количеству осадка к пробной пробирке. Рассчитать по ней содержание свинца в анализируемой пробе.

Представление результатов. Результаты должны быть представлены в виде расчетов содержания свинца в анализируемой воде, которые делаются по формуле:

$$C = a/V,$$

где C – концентрация свинца в воде, мг/л;

a – содержание свинца в соответствующей пробирке шкалы, мг;

V – объем взятой для анализа воды, л.

Сравнить полученные результаты с допустимой концентрацией свинца в воде.

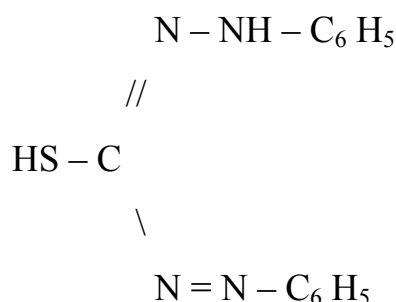
ОБНАРУЖЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В РАСТЕНИЯХ ГИСТОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Цель работы: выявить наличие тяжелых металлов в среде обитания растений и изучить их распределение в растении.

Тяжелые металлы – опасные загрязнители окружающей среды. Многие растения аккумулируют металлы, концентрация которых в клетках и тканях превышает их содержание в почве. Способность растений аккумулировать тяжелые металлы с успехом используют для очистки почвы, водоемов, воздуха от загрязнения.

Изучение локализации тяжелых металлов в растительных тканях, их способности к передвижению важно для понимания реакции на них растений. Кроме того, определение содержания тяжелых металлов имеет важное значение для экологического мониторинга.

Методы работы. Работа основана на способности тяжелых металлов давать красное окрашивание при реакции с дитизоном.



Дитизон обладает высокой чувствительностью к кадмию и свинцу и образует в присутствии исследуемых металлов нерастворимые соли – дитизонаты, обладающие красной окраской. Дитизон и дитизонаты практически нерастворимы в нейтральных и кислых водных растворах. Помимо кадмия и свинца дитизон может образовывать окрашенные комплексы с такими металлами как цинк, кобальт, медь, хром, железо и никель, поэтому этот реактив может использоваться для обнаружения широкого круга металлов.

Для обнаружения тяжелых металлов используются проростки подсолнечника, огурца, гороха, кукурузы и т. д. Для кукурузы

установлены концентрации нитрата свинца и нитрата кадмия (10^{-3} М и 10^{-4} М соответственно), которые ингибируют рост корня на 50%.

С помощью реакций с дитизоном можно исследовать любые растения одного вида и их органы с территорий с различной степенью загрязнения. Можно выращивать растения на средах (почва, вода), отобранных в разных условиях и этим методом сравнивать степень их загрязнения тяжелыми металлами. Следует помнить, что обязательно должен быть контрольный вариант, выращенный на среде без тяжелых металлов.

Реактивы.

1% раствор KMnO_4 или слабый раствор формалина

2. Дитизон

Оборудование.

Чашки Петри

Фильтровальная бумага

Маркер по стеклу

Мерный цилиндр на 25 мл

Термостат

Предметные и покровные стекла

Микроскоп

Содержание работы

Зерновки кукурузы среднего размера (или семена растений другого вида) обрабатывают в течение 10-20 минут слабым раствором формалина или перманганата калия. Затем их раскладывают по 7 штук в чашки Петри на фильтровальную бумагу и наливают в каждую чашку мерным цилиндром по 20 мл изучаемого субстрата, а в контрольный вариант 20 мл дистиллированной воды. Чашки с семенами кукурузы выдерживают в термостате при 26° (для других видов растений температура может быть иной) в течение 7 дней.

Для определения наличия, относительного количества и мест локализации тяжелых металлов готовят серии поперечных срезов корня на разных расстояниях от апекса, а также срезы coleoptilya, mesokotilya и первых листьев на разных расстояниях от их оснований.

Серии срезов помещают на предметное стекло, капают 3-4 капли дитизона, накрывают покровным стеклом и через несколько минут рассматривают под микроскопом при разных увеличениях, отмечая ткани, локализовавшие тяжелые металлы.

Представление результатов. Результаты работы должны быть представлены в виде рисунков поперечных срезов корня проростков для каждого варианта опыта, на которых отмечаются места локализации тяжелых металлов.

Делается вывод о наличии и относительном содержании в исследуемых пробах среды тяжелых металлов и о возможности продвижения тяжелых металлов по тканям и о существовании барьера для их передвижения по тканям корня.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ СУБСТРАТОВ С ПОМОЩЬЮ БИОТЕСТА НА ПРОРОСТКАХ

Цель работы: определить степень загрязнения субстратов по состоянию корневых систем проростков.

Методы работы. В основе работы лежит метод измерения длин корней проростков, т. к. они очень чувствительны к состоянию окружающей среды, выращенных на разных субстратах и сравнения полученных результатов.

Реактивы.

1% раствор KMnO_4 или слабый раствор формалина

Оборудование.

Чашки Петри

Фильтровальная бумага

Пипетка мерная

Маркер по стеклу

Термостат

Линейка или полоска миллиметровой бумаги

Весы технические

Содержание работы

Среднего размера семена огурца, кресс салата, горчицы или других растений помещают на 10-20 минут в слабый раствор формалина или перманганата калия. Затем их раскладывают по 12 штук в чашки Петри на фильтровальную бумагу и наливают в каждую чашку мерной пипеткой по 10 мл испытуемой жидкости. Образцы водных сред могут быть взяты из городского водопровода, различной степени загрязнения водоемов, отстойников и т. д.). В контрольный вариант вносят 10 мл дистиллированной воды.

При оценке загрязнения твердого субстрата (почва, сточные осадки и т.д.) на технических весах берется его навеска, равная 5 г и равномерно распределяется по дну чашки Петри. Сверху кладется бумажный

фильтр, который заливается на сутки 30 мл дистиллированной воды. На следующий день их также раскладывают в чашки Петри на фильтровальную бумагу по 12 штук.

Чашки Петри с семенами помещают в термостат при температуре 26⁰С на четверо суток.

Выбирают 10 однородных проростков, у которых линейкой или полоской миллиметровой бумаги измеряют длину главного корня и зоны боковых корней. Данные вносят в таблицы 1 и 2.

Таблица 1.

Варианты опыта	Длина главного корня, см												Длина зоны боковых корней, см											
	Повторности												Повторности											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Σ	X _{ср}	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Σ	X _{ср}

При отсутствии статистической обработки ингибирующий или стимулирующий эффект оценивают ±15% (тройная ошибка при 5%-ном уровне статистической достоверности). Санитарно-токсикологическое значимое воздействие принимают при степени ингибирования 30 %.

Таблица 2.

Вариант опыта	Средняя длина главного корня		Средняя длина зоны боковых корней	
	см	%	см	%
		100		100

Представление результатов. Результаты работы должны быть представлены в виде заполненных таблиц.

Делается вывод о наличии ингибирующего или стимулирующего эффекта и санитарно-токсикологического значимого воздействия субстратов на состояние корневых систем проростков. Среды характеризуются с экологической точки зрения по данным биотестирования.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ПРАВИЛА ОБРАЩЕНИЯ С ОБОРУДОВАНИЕМ И ОСОБЕННОСТИ ОСНОВНЫХ ПРИБОРНЫХ МЕТОДОВ БОЛЬШОГО СПЕЦИАЛЬНОГО ПРАКТИКУМА

1. ВЗВЕШИВАНИЕ

Лаборатория оснащена электронными техническими (точность 0,01 г) и аналитическими (точность 0,0001 г) весами. Правила работы на этих весах аналогичные и будут рассмотрены вместе.

Порядок работы на аналитических весах

Включить весы в сеть.

Нажать на клавишу «Включение», на табло появится нулевое значение.

Поместить в центр чашки весов тару, в которой будет производиться взвешивание и дождаться установления определенного значения массы. ***Взвешивание реактивов непосредственно на чашке весов недопустимо! При взвешивании жидкостей нельзя допускать их попадания на весы!***

Нажать на клавишу «TARE» для того, чтобы прибор принял ее массу за нулевую и дождаться появления нулевого значения на табло.

Поместить в тару взвешиваемое вещество и дождаться установления определенного значения массы.

Снять с весов всю нагрузку, выключить их нажатием клавиши и из сети.

В случае просыпания сыпучих веществ очистить от них весы мягкой тканью или путем их выдувания.

Накрыть весы чехлом от пыли и защиты экрана от выгорания на солнце.

Торзионные весы

Торзионные весы дают возможность достаточно быстро и точно проводить взвешивания в пределах 500 мг.

Основным элементом торзионных весов является плоская спиральная пружина, которая под действием взвешиваемого предмета деформируется.

Величина деформации пружины пропорциональна действующей нагрузке, и поэтому шкала весов, показывающая угол закручивания пружины, градуирована в весовых единицах. Постоянство показаний весов обеспечивается высоким качеством пружины.

Порядок работы на торзионных весах

Остановимся на порядке работы на торзионных весах в случае ***определения массы предмета***, которая не должна превышать 500 мг. Открыть крышку, поместить на подвеску взвешиваемый предмет и снова закрыть крышку.

Освободить коромысло (снять с арретации весы) перемещением закрепительного рычага в нижней левой части весов в правую сторону.

Плавно начать поворачивать рукоятку указателя веса, следя за указателем равновесия в нижней части корпуса весов. Как только последний совместится с чертой равновесия, записать показание на шкале груза, напротив которого находится указатель веса.

Заарретировать коромысло, снять груз и вернуть указатель веса в исходное положение.

Для ***взятия навески*** не превышающей 500 мг последовательность действий будет несколько другой.

Освободить коромысло (снять с арретации весы) перемещением закрепительного рычага в нижней левой части весов в правую сторону.

1. Рукояткой указателя веса установить численное значение массы навески, которую необходимо взять.
2. Открыть крышку, небольшими порциями начать помещать на подвеску взвешиваемое вещество (части растений), следя за указателем равновесия в нижней части корпуса весов. Совмещение последнего с чертой равновесия будет означать достижение необходимой массы навески.
3. Заарретировать коромысло, снять груз и вернуть указатель веса в исходное положение.

2. ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Центрифугирование используется для быстрого отделения осадка от надосадочной жидкости. Для этих целей используется центрифуга, например центрифуга лабораторная медицинская ОПН-8 с частотой вращения до 8000 оборотов в минуту. Она обеспечивает центрифугирование жидких систем плотностью не более 2 г/см^3 , при работе со стеклянными пробирками – жидких систем плотностью не более $1,5 \text{ г/см}^3$. Максимальный объем центрифугата составляет 180 мл.

Частота вращения ротора центрифуги регулируется ступенчато от 1000 до 8000 оборотов в минуту. Центрифуга обеспечивает автоматическое отключение от сети 60-минутным механизмом отсчета времени через заданный интервал циклами, кратными 5 минутам.

Порядок работы на центрифуге

1. Жидкости, приготовленные для центрифугирования, помещают в специальные пластмассовые предварительно подписанные центрифужные пробирки. Жидкость в пробирках не должна доходить до верхнего края пробирки примерно 1 см, иначе она выплеснется при центрифугировании. Перед загрузкой в гнезда центрифуги пробирки попарно уравниваются на аптечных

весах, после чего уравновешенные пробирки устанавливаются строго напротив друг друга в соответствующие гнезда. Далее закручивается металлическая крышка центрифуги и затем закрывается стеклянная крышка.

2. Центрифуга включается в розетку.
3. Переключателем на пульте управления устанавливается частота вращения от 1000 до 8000 оборотов в минуту.
4. Ручкой часового механизма задается продолжительность работы центрифуги.
5. Нажимаются две клавиши, расположенные на пульте управления параллельно друг другу. Левая запускает и останавливает работу часового механизма. Правая замыкает и размыкает цепь питания центрифуги.
6. По истечении заданного срока центрифуга остановится автоматически. *Только дождавшись ее полной остановки* можно отвинтить крышку и достать центрифужные пробирки.
7. Выключить клавиши пуска и остановки часового механизма и регулирования питания центрифуги.
8. Выключить центрифугу из розетки.

3. НАГРЕВАНИЕ ПРОБ НА БАНЕ ЛАБОРАТОРНОЙ

Для нагревания проб до заданной температуры и поддержания стабильной температуры в пробирках предназначена баня лабораторная ПЭ-4300. Баня может применяться для проведения различных процессов в фиксированных температурных условиях в диапазоне от температуры окружающей среды до $+100^{\circ}\text{C}$. Это сложное электротехническое устройство с микропроцессорным управлением и индикацией текущих параметров функционирования.

Порядок работы на бане лабораторной

1. Убедиться в том, что ванна бани заполнена теплоносителем, уровень которого не ниже 30 мм от крышки. В противном случае заполнить ванну дистиллированной водой с добавлением карбоната натрия до концентрации 0,1 г/л. Объем ванны составляет 13,5 л.
2. Подключить баню к сети переменного тока, для этого вставить штепсельную вилку в розетку сетевого питания.
3. Включить баню выключателем сетевого питания СЕТЬ и проконтролировать свечение зеленым цветом индикатора АВАРИЯ, а на цифровом индикаторе ТЕМПЕРАТУРА значение установки температуры.
4. Задать на цифровом индикаторе ТЕМПЕРАТУРА с помощью кнопок НАБОР ◀ и НАБОР ▶ необходимое значение температуры нагревания теплоносителя.
5. Нажать на кнопку УСТАНОВКА для перевода бани в рабочий режим нагревания. При этом свечение светодиодного индикатора АВАРИЯ должно измениться с зеленого цвета на переменный красно-зеленый, а на цифровом индикаторе ТЕМПЕРАТУРА должно отображаться текущее значение температуры теплоносителя.
6. Поместить подготовленную химическую посуду в нагретый до необходимой температуры теплоноситель и прикрыть ее съемными кольцами.

Примечание:

- *Установленное значение температуры нагревания теплоносителя сохраняется в памяти электронного блока и воспроизводится при последующих включениях бани.*

- *Не допускать полного испарения воды в бане во время ее работы. При недопустимом уменьшении уровня теплоносителя в ванне индикатор АВАРИЯ начинает светиться красным цветом.*

7. По окончании работы выключить баню выключателем сетевого питания СЕТЬ и вилку из розетки.

4. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH

Для определения pH растворов в лаборатории имеется pH-метр «Анион-4100», который укомплектован pH-электродом. Диапазон значений измерения pH составляет 0,01. Время прогрева прибора составляет 5 минут.

В основу измерений положена прямая потенциометрия – измерение значения электродвижущей силы (ЭДС) гальванического элемента специального электрода и преобразование ее в значения pH. Прибор адаптирован к методу градуировочного графика, который заключается в построении графика зависимости ЭДС электродной системы от концентрации градуировочных растворов с последующим нахождением pH анализируемого раствора по измеренному в нем значению ЭДС электродной системы. Градуировочный график строится микропроцессором прибора автоматически на основе введенных в него значений ЭДС электродной системы в градуировочных растворах и соответствующих им значений pH.

Таким образом, перед работой с прибором проводится его *градуировка* – ввод в память прибора параметров электродной системы, получаемых в стандартных растворах. При этом, по сути, фиксируется отклик электрода pH на помещение его в раствор с известным значением pH. Минимальное число точек градуировки, обеспечивающих измерения по методу градуировочного графика, составляет две.

Градуировка pH-метра

Измерения на pH метре можно производить только после его градуировки. Практически, правильно эксплуатируемый и обслуживаемый прибор, нуждается в двухточечной калибровке 1-2 раза в неделю. Градуировка производится в стандартных растворах. Например, можно использовать буферные растворы имеющие значения pH 4,01 и 9,18.

1. Для проведения градуировки следует выбрать режим ГРАДУИРОВКА. При этом прибор предложит вам список значений pH возможных стандартных растворов.

2. Выберите маркером значение pH стандарта и нажмите ВВОД, при этом прибор выведет на экране сообщение «сброшен» или параметры выбранного стандарта (ЭДС, t^0).

3. Поместите электрод pH и датчик температуры в градуировочный раствор заданной концентрации.

4. Установите маркер на позицию ГРАД и нажмите клавишу ВВОД. Прибор перейдет к градуировке и выведет на экран текущие значения градуировочных параметров. Дождитесь установления показаний ЭДС и нажмите клавишу ОТМЕНА, если значения вызывают сомнения и вы не хотите изменять параметры стандарта, находящиеся в памяти прибора. Если значения не вызывают сомнений и вы хотите ввести их в память прибора, нажмите клавишу ВВОД.

5. Повторите все операции для введения в память прибора второго стандарта.

Позиция СБРОС в общем списке стандартов позволяет сбросить все стандарты одновременно, а СБРОС в блоке параметров конкретного стандарта – только его значение.

Измерения pH

Поместите датчики в исследуемый раствор и перемешайте раствор для ускорения процесса установления температурного режима. Прибор

автоматически (даже после следующего включения) перейдет в экран ИЗМЕРЕНИЙ. Выждите 1 минуту для установления температурного равновесия между датчиками и раствором. На экране ИЗМЕРЕНИЯ можно наблюдать следующие значения:

- активности ионов в единицах pH;
- ЭДС электродной системы в мВ;
- температуры.

Внимание!

- Содержите электроды и датчик температуры в чистоте, что является залогом точности измерений.
- После каждого замера промывайте датчики дистиллированной водой и затем удаляйте капли воды фильтровальной бумагой.
- В период между измерениями датчики должны храниться опущенными в дистиллят или в специальном чехле, заполненном дистиллятом.
- pH-метр хранится в чехле, закрывающем прибор от пыли и защищающем экран от выгорания.

5. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТ-ИОНОВ

Для потенциометрического определения pH используется прибор «Анион 410». Данный прибор – совершенный инструмент для решения научных и прикладных задач. Он прост в использовании и Вы, если даже ни с чем подобным раньше не встречались, легко освоите его.

Первым этапом работы с прибором является его градуировка – ввод в память прибора параметров электродной системы, получаемых в стандартных растворах. При этом, по сути, фиксируется отклик нитрат-селективного электрода на помещение его в раствор с известным значением концентрации нитрат-ионов. Минимальное число точек

градуировки, обеспечивающих измерения по методу градуировочного графика, составляет две. Для этого необходимо подготовить градуировочные стандарты и электроды.

1. Подготовка градуировочных стандартов

В данной работе градуировку проводят по четырем стандартам раствора KNO_3 с концентрацией соответственно 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 моль/л. Для приготовления первого раствора (0,1 М/л – исходного) 10,110 г KNO_3 (предварительно высушенного при $t=100-105^0$ С) растворяют в мерной колбе на 1000 мл. Для приготовления каждого последующего раствора из предыдущего отбирают аликвоту и разводят дистиллятом в 10 раз (1:9). Для проведения градуировки достаточно 100 – 150 мл каждого стандартного раствора..

2. Подготовка электродов

2.1 Вспомогательный лабораторный (хлорсеребряный)

Электрод перед началом работы следует заполнить насыщенным при 20 ^0C раствором KCL. (Примерно в 300мл дистиллята растворять KCL пока на дне не появится тонкий слой осадка). После заполнения электрод погружают в этот раствор и выдерживают 48 часов.

Хранить электрод следует в том же растворе, но закрытым пробкой. Непосредственно перед началом работы пробка должна быть снята.

2.2 Нитрат – селективный электрод

Существует два типа электродов. Один тип электрода перед началом работы заполняют смесью растворов 0,1М KNO_3 и 0,1М KCL, которая вводится через отверстие в верхней части электрода при помощи шприца. Заполнение электрода производят, так чтобы внутри не образовалось воздушных пузырьков, препятствующих контакту м/у электролитом и мембраной. Если есть подозрения, что они возникли,

встряхните электрод как градусник. В норме электрод должен давать отклик на стандарт 0,01M (KNO_3) ЭДС=100+-20Мв. Время установки потенциала примерно 3 мин.

Перед каждым новым измерением электрод необходимо ополаскивать дистиллятом и высушивать фильтровальной бумагой. Хранить электрод следует в 0,01M растворе KNO_3 .

Другой тип электрода готовят в течение 24 часов, просто вымачивая его в растворе 0.01M KNO_3 . В период между определениями хранят так же, как и первый электрод.

2.3 Датчик температуры

Помимо электродов, данный прибор оснащен термодатчиком для определения температуры растворов. Он не требует особой подготовки, но помните, что необходимо погрузить датчик в исследуемый раствор на 2/3 его длины. Кроме того, температуры раствора, электрода и датчика различны, а потому при опускании их в раствор температура последнего изменится, стремясь к равновесному значению. Подождите около минуты и только потом фиксируйте показания.

Работа с прибором «Анион 410»

На передней панели находится экран, клавиши управления (с ними познакомимся по ходу работы, а сейчас отметим только то, что ***выйти из любого режима и вернуться к предыдущему состоянию можно с помощью клавиши «отмена»*** и гнезда для датчиков.

1. Крайнее правое гнездо предназначено для датчика температуры.
2. Верхний ряд гнезд слева, пронумерованных соответственно 1; 2 и 3, предназначен для селективных электродов. Электроды, имеющие BNC разъем, подключаются с BNC переходником.

3. *Нижний ряд гнезд слева предназначен для вспомогательных электродов и экранов селективных электродов (если последние есть). Эти гнезда соединены между собой и поэтому экран или вспомогательный электрод можно подсоединить к любому из них независимо от того, к какому каналу подключен селективный электрод.*

Подсоедините все датчики и включите прибор, перед началом работы ему необходимо прогреться в течение трех минут.

Прежде чем приступать к измерениям, необходимо ввести в память прибора следующие данные:

1. **Установки**

Нажмите клавишу **«установка»** и прибор перейдет в этот режим (при включении он автоматически устанавливает режим **«измерения»**). Установите маркер (черный прямоугольник) на:

Мх и нажмите кнопку **«ввод»**, далее, используя стрелки, введите значение относительной молярной массы иона (стрелки вверх/вниз меняют значение, а влево/вправо – разряд числа). Для ввода в память нажмите **«ввод»**.

рНи – установка изопотенциальной точки для обеспечения измерений с автоматической температурной компенсацией (АТК). Значения берутся из паспорта электрода. Эта функция используется если температура стандартного и исследуемого растворов резко различны. Для ее активации поместите маркер на третью позицию в командной строке (- - -) и нажмите **«ввод»**, этой же клавишей можно отключить АТК.

инт – установка интервала для автоматической записи. Если вы имеете дело с динамичным процессом и вам необходимо фиксировать изменения по мере его протекания это можно сделать в автоматическом

режиме. Если вы установите какой либо интервал отл. От 00.00 то вернувшись в режим измерений увидите в правом верхнем углу значок А (автоматическая вместо Р:00 – ручная) и значение интервала. Теперь если вы просто поместите маркер на этот значок, включится автоматическая запись.

t – ручной ввод температуры (с другого прибора).

min/max – установка границ контроля допуска, если работа того требует можно установить значения минимума и максимума, при выходе за которые прибор известит вас звуковым сигналом.

Примечание: установки, кроме 1.1, в проводимой на специальном практикуме работе не используются.

3. Градуировка

В этом режиме прибор фиксирует параметры стандартных растворов (t-температура, ЭДС и S-крутизна градуировочной характеристики электрода, Мв/Рх). Для измерения в памяти прибора должно быть как минимум 2 стандарта, максимум – 6, в данной работе – 4.

Для проведения градуировки нажмите клавишу «**градуировка**» и прибор перейдет в этот режим.

В верхней строке вы увидите позиции: «?», «град», «1;2 или 3», «сброс», а ниже располагаются шесть значений Рх – значений стандартных растворов.

Сначала выберите № канала, с которым вы работаете (это номер гнезда в который включен селективный электрод и третья позиция маркера в верхней строке команд). Его значения можно менять, установив маркер на число в командной строке и нажимая «**ввод**».

Теперь выберите из предложенных значений Рх близкое или равное вашему стандарту и нажмите «**ввод**» теперь если это требуется, подкорректируйте это значение стрелками и нажмите «**ввод**». На экране

появятся параметры выбранного стандарта. Их можно сбросить, установив маркер на позицию **«сброс»** и нажав **«ввод»** (см. примечание).

Для проведения градуировки по Вашему стандарту установите маркер в положение **«град»** и нажмите **«вод»**. Прибор перешел к градуировке, и вы видите текущие параметры. Дождитесь пока они относительно стабилизируются и нажмите **«ввод»**. Эти параметры сохранились в памяти, и в списке появится галочка напротив значения P_x измеренного стандарта. Таким знаком обозначаются все стандарты, параметры которых есть в памяти. К списку можно вернуться клавишей **«отмена»**.

Примечание.

Если в памяти 4 стандарта, а вы делаете работу, в которой используются 3, то, выполнив градуировку по своим стандартам, сотрите лишний (смотри предыдущий абзац). Для повышения точности измерений рекомендуется проводить градуировку перед каждой работой.

4. Измерения

После завершения градуировки нажмите клавишу **«измерение»** и прибор, перейдя в этот режим позволит вам измерить параметры опытного раствора.

Для этого выберите канал, с которым вы работаете, установив маркер на третью позицию в верхней – командной строке и нажимая **«ввод»**.

Далее установите маркер на вторую позицию и нажимая **«ввод»** выберите параметр который вы хотели бы измерить:

1. P_h – измерение активности ионов в единицах P_x (в данной работе P_{no3}).
2. ЭДС – измерение ЭДС электродной системы в Мв.

3. М – измерение молярной концентрация ионов.
4. С – измерение массовой концентрации ионов в мг/л.

Справа вы можете видеть показания датчика температуры, под ним единицы измерения параметра, а выше в командной строке индикатор режима записи в блокнот **Р:00** – ручной режим. Дождавшись стабилизации показаний, установите маркер в эту позицию и нажмите «**ввод**». В дальнейшем нажав клавишу «**блокнот**» вы можете просмотреть записи, если в режиме **установки** задать интервал автоматической записи, то поместив маркер на эту позицию вы включите автозапись.

Примечание:

установив маркер «?» и нажав «ввод», Вы увидите ряд параметров, относящихся к работе прибора: наличие/отсутствие в памяти стандартов, интервал записи в блокнот, значение изопотенциальной точки и напряжение питания прибора.

6. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

Спектрофотометрия является методом молекулярной спектроскопии. При спектрофотометрии источником излучения является лампа накаливания с вольфрамовой нитью, дейтериевая или галогено-кварцевая. Определяемый компонент переводят в поглощающее свет соединение и помещают на пути излучения.

Спектрофотометрия позволяет количественно определять достаточно малые концентрации вещества в растворе. Концентрацию вещества в исследуемом растворе определяют графически – по калибровочной кривой, что позволяет проводить определение даже в том случае, когда раствор не подчиняется закону Ламберта–Бера.

При использовании единых методов подготовки образца для некоторых показателей выведены формулы, позволяющие рассчитывать концентрацию исследуемого вещества по значениям оптической плотности при определенных длинах волн без построения калибровочной кривой. Этим способом, например, определяют концентрации пигментов.

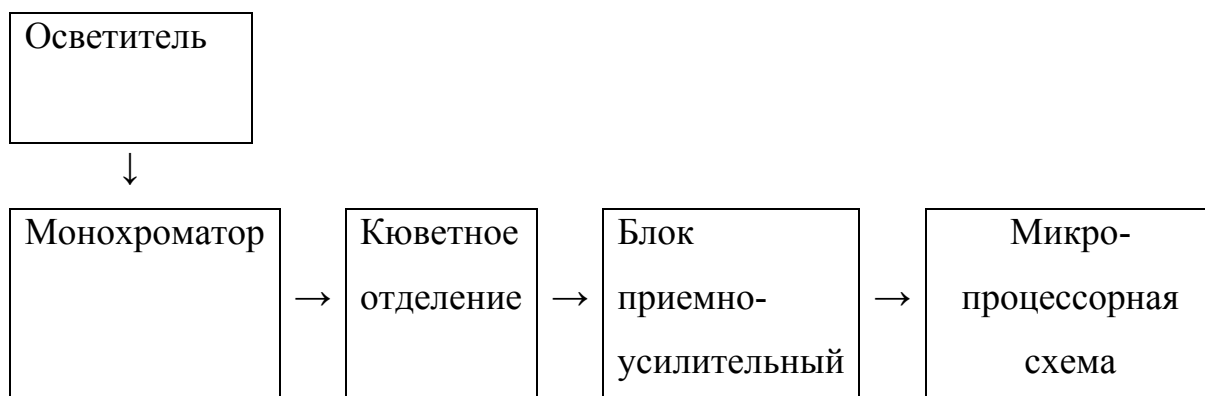
С помощью спектрофотометра также можно измерять спектральные коэффициенты пропускания, оптические плотности и определять скорость изменения оптической плотности.

Иногда для выявления особенностей строения макромолекул рассчитываются коэффициенты, представляющие собой отношение оптических плотностей при определенных длинах волн.

Принцип действия

В основу работы спектрофотометра положен принцип измерения отношения двух световых потоков: потока, прошедшего через исследуемый образец и потока, падающего на исследуемый образец (или прошедшего через контрольный образец).

Структурная схема спектрофотометра представлена на рисунке.



Световой пучок из осветителя попадает в монохроматор через входную щель и разлагается дифракционной решеткой в спектр. В

монохроматический поток излучения, поступающий из выходной щели в кюветное отделение, поочередно вводятся контрольный и исследуемый образцы. Излучение, прошедшее через образец, попадает на катод фотоэлемента в приемно-усилительном блоке. Электрический ток, прошедший через резистор R_n , который включен в анодную цепь фотоэлемента, создает на резисторе падение напряжения, пропорциональное потоку излучения, падающего на фотокатод.

Усилитель постоянного тока с коэффициентом усиления, близким к единице, обеспечивает передачу сигналов на вход микропроцессорной системы (МПС). МПС по команде оператора поочередно измеряет и запоминает напряжение U_T , U_0 и U , пропорциональные темновому току фотоэлемента, потоку, прошедшему через контрольный образец и потоку, прошедшему через исследуемый образец. После измерения МПС рассчитывает коэффициент пропускания T исследуемого образца по формуле

$$T = \frac{U - U_T}{U_0 - U_T} \cdot 100.$$

Значение измеренной величины высвечивается на цифровом фотометрическом табло.

Устройство спектрофотометра СФ-46

Поскольку спектрофотометр является ламповым прибором, ему необходимо предварительное прогревание. Прибор оснащен двумя лампами: вольфрамовой лампой накаливания для работы в области видимого света ($\lambda = 340\text{--}1100$ нм) и дейтериевой лампой для измерений в ультрафиолетовой области ($\lambda = 190\text{--}350$ нм). Стабильная работа спектрофотометра обеспечивается через 30 минут после его включения, которое надо проводить в следующем порядке:

1. Включить прибор в сеть.

2. Проверить, что рукоятка находится в положении **«Закрыто»**, что означает, что фотоэлемент закрыт.
3. Нажать клавишу **«Пуск»**, после чего на табло должна высветиться точка (запятая).

Определение оптической плотности

1. Исследуемые и контрольный (необходимый для учета оптической плотности реактивов) образцы заливаются в хорошо промытые кварцевые кюветы. Держать кюветы следует только за матовые грани. Рабочие грани перед измерением должны быть тщательно протерты фильтровальной бумагой. Загрязнение или капли раствора на рабочих частях граней приводят к неточности измерений.
2. Кюветы устанавливаются в держателе, а он помещается на каретку в кюветном отделении.
3. Кювета с контрольным образцом помещается на пути потока излучения.
4. Вращением барабана устанавливается необходимое значение длины волны.
5. Нажать клавишу **«Ш(0)»**, при этом на табло высветится числовое значение выходного напряжения в вольтах, которое должно быть в диапазоне **от 0,05 до 1**. Если значение не попадает в заданный интервал, необходимо очень аккуратно плавным поворотом рукоятки **«Ноль»** подвести нужное значение, проверяя его нажатием клавиши **«Ш(0)»**. При нажатии клавиши **«Ш(0)»** определяется выходное напряжение при неосвещенном фотоэлементе.
6. Установить рукоятку в положение **«Открыто»**. При этом очень важно не задевать рукоятку настройки нуля, которая расположена очень близко к рукоятке **«Открыто»**!
7. Для введения сигнала сравнения необходимо нажать клавишу **«К(1)»**. Числовое значение выходного значения в вольтах, высветившееся на табло, должно оказаться в диапазоне **от 0,5 до 5,0**.

Если появляется другое значение, следует изменить ширину щели переключением рукоятки «Щель» и повторным нажатием клавиши «К(1)». При нажатии клавиши «К(1)» определяется выходное напряжение при световом потоке, прошедшем через контрольный образец.

8. Нажать клавишу «Д(5)», при этом на табло должно появиться показание $0,000 \pm 0,001$, а слева индекс «5». Если показание имеет другое значение, необходимо еще раз нажать клавишу «К(1)», а затем снова клавишу «Д(5)» .

9. Установить рукоятку в положение «Закрыто». Положение «Открыто» устанавливается только перед нажатием клавиш «К(1)» и «Д(5)»! Все остальное время рукоятка должна находиться в положении «Закрыто», чтобы не расходовать фотоэлемент!

10. Установить на пути потока излучения измеряемый образец, переместив каретку рукояткой.

11. Установить рукоятку в положение «Открыто».

12. Нажать клавишу «Д(5)». При этом происходит вычисление и высвечивание на фотометрическом табло значения оптической плотности.

Внимание! При проведении измерений все клавиши следует нажимать не чаще, чем один раз в 2 секунды!

13. Установить рукоятку в положение «Закрыто» и снять показания с фотометрического табло.

14. Аналогичным образом померить остальные образцы, каждый раз после установки новой партии кювет настраивая прибор и вводя сигнал сравнения.

Для выключения прибора выключается кнопка «Сеть» и вилка из розетки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бухвалов В.А., Богданова Л.В., Купер Л.З. Методы экологических исследований. – М. ЛА «Варяг», 1995. – 167 с.*
- Воробьева Л.А. Химический анализ почв. – М.: Изд-во МГУ, 1998. – 272с.*
- Денисов С.И. Полевая практика по экологии. – Минск, 1999.–119 с.*
- Основы аналитической химии. – М.: Наука, 1996. – 345с.*
- Панин М.С. Аккумуляция тяжелых металлов растениями Семипалатинского Прииртышья.- Семипалатинск, 1999. – 309с.*
- Методы экологического мониторинга: Большой специальный практикум: Учеб. пособие. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2005. – 236 с.*
- Справочник по гидрохимии. WWW.ecolinn.ru/mc/hydrochem/*
- Aebi H. Catalases // Methods of Enzymatic Analysis. 1971. V.3. P. 273-286.*
- Chance B., Maehly A.C. Assay catalase and peroxidase. Methods in Enzymology. Academic Press, New York, 1955, P. 764-775.*
- Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups // Arch. Biochem. Biophys. 1959. V. 82. P. 70-77.*
- Foyer C. H., Holliwell B. The presence of glutathione and glutathion reductase in cloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism // Planta. 1976. V. 13. P. 21-25.*
- Nagalakshmi N., Prasad M. N. V. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus* // Plant Sci. 2001. V. 160. 291-299.*
- Paoletti F., Macali A. Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation // Methods Enzymol. 1990. V. 186. P. 209-220.*
- Shakterle T. R. A simplified method for the quantities assay of small amounts of protein in biological material // Analytical Bioch. 1973. V. 51. № 2. P. 654-655.*

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Охарактеризуйте условия выбора и возможности модельного эксперимента.
2. Назовите преимущества и недостатки модельного эксперимента в сравнении с опытами в природных условиях.
3. Каковы основные принципы проведения модельного эксперимента?
4. Какие растительные объекты удобно использовать в модельном эксперименте?
5. Приведите примеры монофакторных модельных экспериментов.
6. Охарактеризуйте основные принципы проведения биотестирования.
7. Какие живые объекты используются в биотестировании?
8. Каковы ПДК для почвенной среды по основным тяжелым металлам?
9. Каковы ПДК для водных систем по основным тяжелым металлам?
10. Назовите причины перекисного окисления липидов в клетках.
11. Опишите последовательность выделения продуктов перекисного окисления липидов.
12. Как осуществляется подготовка растительного материала для определения продуктов перекисного окисления липидов?
13. Как производят расчеты ПОЛ с учетом коэффициентов экстинкции?
14. Назовите основные принципы измерения продуктов перекисного окисления липидов на СФ-46.
15. Охарактеризуйте основные защитные механизмы растений от действия тяжелых металлов.
16. Назовите основные принципы определения SH-белков с использованием реактива Элмана. Как готовится растительный материал?
17. Опишите последовательность выделения белков из растительной ткани.
18. Как определяют SH-группы в белках?

19. Каким образом строится калибровочная кривая и как по ней рассчитывается содержание SH-групп?
20. Почему по содержанию SH-групп можно судить о действии поллютантов?
21. Как определяют содержание белков в растительных тканях?
22. Каким образом строится калибровочная кривая и как по ней рассчитывается содержание белков?
23. В чем суть изменения пигментного комплекса хлоропластов при действии поллютантов на растения?
24. Почему каротиноиды более устойчивы к действию тяжелых металлов?
25. Как можно интерпретировать отношение хлорофиллы/каротиноиды?
26. Охарактеризуйте основные растворители, используемые для выделения пигментов.
27. Какова последовательность выделения пигментов?
28. Каковы основные условия выделения пигментов?
29. Охарактеризуйте возможности использования спектрофотометрии в мониторинговых исследованиях.
30. Назовите основные принципы работы спектрофотометра.
31. Назовите основные принципы измерения пигментного экстракта на СФ-46.
32. Каковы принципы расчета пигментов на единицу площади листа?
33. Каковы принципы расчета пигментов на 1 г сухого веса?
34. В чем суть определения NO_3^- в растительном материале потенциометрическим методом с использованием селективного электрода?
35. Как осуществляется подготовка растительного материала или воды для определения нитратов и выделения NO_3^- ?
36. Каковы ПДК по нитратам для основных сельскохозяйственных растений?

37. Каковы источники нитратов в почве?
38. Каковы источники нитратов в водных системах?
39. Как влияет избыток нитратов в продуктах питания на здоровье человека?
40. Каковы основные факторы, влияющие на содержание кислорода в воде и последствия изменения концентрации O_2 в водной среде?
41. Назовите основные принципы определения кислорода химическим методом.
42. Назовите причины колебания содержания кислорода в воде в течение разных сезонов.
43. Каковы последствия снижения кислорода для водных животных?
44. Какова последовательность анализа кислорода и расчет содержания O_2 ?
45. Как производят забор воды в природных водоемах для оценки содержания кислорода?
46. Назовите методы быстрого тестирования растений на загрязнение среды.
47. Перечислите живые объекты, используемые для тестирования среды на загрязнение.
48. Перечислите принципы тест-метода, основанного на окрашивании сафранином растений, содержащих тяжелые металлы.
49. Как определяют степень повреждения клеток ионами металла при использовании окрашивания сафранином?
50. Каков принцип работы газоанализатора «Палладий», используемый для определения CO?
51. Опишите последовательность определения CO с помощью прибора «Палладий». Как произвести расчет содержания CO в воздухе?
52. Каковы основные источники CO в воздухе?
53. Назовите принципы вольтамперометрического метода измерения тяжелых металлов.

54. Как осуществляется подготовка образца растительного материала для определения Си вольтамперометрическим методом?
55. Как производят расчет содержания тяжелых металлов при использовании вольтамперометрического метода?
56. Каким образом можно сравнить загрязненность воздуха разных территорий соединениями серы на основании содержания сульфатов в коре растений?
57. Каков принцип турбодиметрического метода?
58. Какая реакция лежит в основе определения содержания сульфат-ионов в растениях?
59. Как осуществляется подготовка растительного материала для определения сульфат-ионов?
- 60 Назовите основные принципы измерения содержания сульфат-ионов на СФ-46.
61. Каким образом строится калибровочная кривая и как по ней рассчитывается содержание сульфат-ионов?
62. Каковы основные источники загрязнения среды производными серы?
63. Каковы основные источники загрязнения среды соединениями свинца?
64. Назовите основные принципы определения содержания свинца в воде.
65. Как осуществляется подготовка пробы воды для определения тяжелых металлов (свинца)?
66. Каким образом определяется концентрация свинца по стандартной шкале?
- 67 Как рассчитывается содержание свинца в анализируемой пробе?
68. В чем заключается недостаток метода определения свинца в воде?
69. Каковы принципы гистохимического метода выявления наличия тяжелых металлов в среде обитания растений?

70. Какие растения используются для выявления наличия тяжелых металлов в среде обитания?
71. Приведите примеры тест-объектов, используемых для оценки загрязнения среды тяжелыми металлами.
72. Какие среды обитания растений можно оценить на содержание тяжелых металлов гистохимическим методом?
73. Какой реактив используется для гистохимического метода выявления наличия тяжелых металлов?
74. Какие тяжелые металлы выявляются при использовании гистохимического метода?
75. Каковы основные принципы метода микроскопирования?
76. В чем заключается ограниченность гистохимического метода выявления наличия тяжелых металлов?
77. Каковы принципы оценки субстратов по биотесту на проростках?
78. Какие растения используются для оценки субстратов по биотесту на проростках?
79. Обоснуйте способы замера корневой системы растений при проведении биотеста на проростках.
80. Какие показатели обычно используют для выводов о наличии ингибирующего или стимулирующего эффекта среды на растение?
81. На каком основании делается вывод о наличии санитарно-токсикологического значимого воздействия среды на растение?
82. Расчеты навесок для приготовления растворов с заданными концентрациями.
83. Назовите известные вам биоиндикационные методы определения загрязнения воды.
84. Назовите известные вам биоиндикационные методы определения загрязнения воздуха.
85. Назовите известные вам биоиндикационные методы определения загрязнения растений.

86. Назовите известные вам биоиндикационные методы определения загрязнения почвы.
87. Как осуществляется расчет навесок для приготовления растворов заданных концентраций (процентные, молярные, нормальные растворы)?
88. Назовите известные вам принципы методов, применяемых при биоиндикационных исследованиях.
89. Каковы значения ПДК меди для водных экосистем? Каковы источники загрязнения?
90. Каковы значения ПДК свинца для водных экосистем? Каковы источники загрязнения?
91. Каковы ПДК ртути, свинца и кадмия при загрязнении почвы?
92. Каковы источники избытка мочевины в водоемах?
93. Каковы последствия загрязнения водных экосистем мочевиной?
94. Почему при загрязнении водных объектов мочевиной возникает ухудшение кислородного режима?
95. Проведите сравнительный анализ методов биотестирования и определения поллютантов в среде химическими методами.
96. Назовите принципы составления научного отчета.
97. Каковы требования к оформлению рисунков к отчету?
98. Назовите основные правила цитирования литературных источников и составления списка литературы в отчете.
99. Каковы требования к составлению научного доклада по самостоятельной работе?
100. Подготовка презентации к докладу по работе.

СО Д Е Р Ж А Н И Е	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	3
ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ	6
ЗАКЛАДКА МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА РАСТЕНИЯ	6
ВЛИЯНИЕ ПОЛЛЮТАНТОВ В СРЕДЕ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ (ПОЛ)	15
СОДЕРЖАНИЕ SH-ГРУПП В РАСТВОРИМЫХ БЕЛКАХ РАСТЕНИЙ КАК ТЕСТ НА ДЕЙСТВИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ	19
СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ РАСТЕНИЙ КАК ТЕСТ НА ДЕЙСТВИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ	24
ПИГМЕНТНЫЙ КОМПЛЕКС РАСТЕНИЙ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ СОСТОЯНИЯ ВОДНОЙ (ВОЗДУШНОЙ) СРЕДЫ	29
РЕЗУЛЬТАТЫ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ	34
ОЦЕНКА УРОВНЯ ЗАГРЯЗНЕННОСТИ ВОДЫ ПО СОДЕРЖАНИЮ В НЕЙ РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА	36
ТЕСТ НА ЗАГРЯЗНЕНИЕ ВОДЫ (ПОЧВЫ) ИОНАМИ Т ЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ	42
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ СОДЕРЖАНИЯ НИТРАТ-ИОНОВ В РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ (ВОДЕ) НОРМАТИВАМ КАЧЕСТВА	46
ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ОКИСИ УГЛЕРОДА В АТМОСФЕРЕ ВОЗДУХА ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ПОМЕЩЕНИЙ	50

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕДИ МЕТОДОМ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ С ГРАФИТОВЫМ ЭЛЕКТРОДОМ	53
ВЫЯВЛЕНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОЗДУХА СОЕДИНЕНИЯМИ СЕРЫ ПО СОДЕРЖАНИЮ СУЛЬФАТОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ	59
УСТАНОВЛЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ НОРМЕ СОДЕРЖАНИЯ СВИНЦА В ВОДЕ РАЗЛИЧНЫХ ВОДОЕМОВ	63
ОБНАРУЖЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В РАСТЕНИЯХ ГИСТОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ	66
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ СУБСТРАТОВ С ПОМОЩЬЮ БИОТЕСТА НА ПРОРОСТКАХ	69
ПРИЛОЖЕНИЕ	72
ПРАВИЛА ОБРАЩЕНИЯ С ОСНОВНЫМ ОБОРУДОВАНИЕМ И ОСОБЕННОСТИ ОСНОВНЫХ ПРИБОРНЫХ МЕТОДОВ БОЛЬШОГО СПЕЦИАЛЬНОГО ПРАКТИКУМА	73
1. ВЗВЕШИВАНИЕ	73
2. ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ	75
3. НАГРЕВАНИЕ ПРОБ НА БАНЕ ЛАБОРАТОРНОЙ	76
4. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH	78
5. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТ-ИОНОВ	80
6. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ	86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	91
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	92
СОДЕРЖАНИЕ	98